



Universidade Federal de Santa Catarina

Centro de Ciências Biológicas

Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia

**Caracterização molecular de uma fosfotransferase
(Arginina Quinase) de *Trypanosoma rangeli***

Carime Lessa Mansur Pontes

Florianópolis

2014



Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia

Trabalho de Conclusão de Curso

**Caracterização molecular de uma fosfotransferase
(Arginina Quinase) de *Trypanosoma rangeli***

Trabalho apresentado para o cumprimento da disciplina Trabalho de Conclusão de Curso II (BIO 7016), como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Santa Catarina.

Acadêmica: Carime Lessa Mansur Pontes

Orientadores:

Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard
Dra. Patrícia Hermes Stoco

Florianópolis, 2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Pontes, Carime Lessa Mansur

Caracterização de uma fosfotransferase (Arginina
Quinase) de *Trypanosoma rangeli* / Carime Lessa Mansur
Pontes ; orientador, Edmundo Carlos Grisard ; co-
orientadora, Patrícia Hermes Stoco. - Florianópolis, SC,
2013.

77 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas.

Inclui referências

1. Ciências Biológicas. 2. *Trypanosoma rangeli*. 3.
Fosfotransferase. 4. Arginina Quinase. I. Grisard, Edmundo
Carlos. II. Stoco, Patrícia Hermes. III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas.
IV. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COORDENADORIA DO CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

BIO-5156 / ESTÁGIO II e BIO-7016

ATA DE APRESENTAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

1. ESTAGIÁRIO(A)

Nome: Carime Lessa Mansur Pontes

Número de Matrícula: 09128008

2. ESTÁGIO

Título do Trabalho: **Caracterização de uma fosfotransferase (Arginina Quinase) de *Trypanosoma rangeli***

Orientador: Edmundo Carlos Grisard

Co-Orientadora: Patrícia Hermes Stoco

Período do Estágio:

Local da apresentação do Trabalho: Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Sala 008

3. AVALIAÇÃO

BANCA EXAMINADORA:

Presidente: Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard Nota: 10,0

Membro Titular: Prof. Dr. Rafael Diego da Rosa Nota: 10,0

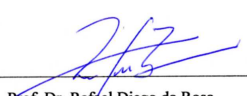
Membro Titular: Prof. Dr. Fernando Spiller Nota: 10

Membro Suplente: Dra. Milene Moraes Nota: 10,0

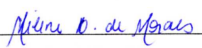
MÉDIA FINAL : 10,0 (DEZ)

Florianópolis, 13 de fevereiro de 2014.


Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard
PRESIDENTE DA BANCA


Prof. Dr. Rafael Diego da Rosa
MEMBRO TITULAR


Prof. Dr. Fernando Spiller
MEMBRO TITULAR


Dra. Milene Moraes
MEMBRO SUPLENTE

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Dr. Edmundo Carlos Grisard, pela oportunidade de estagiar no laboratório e, principalmente, pelos ensinamentos, tanto os ligados à pesquisa, quanto também aqueles que me impediram de enlouquecer nos momentos finais da graduação. Obrigada pelas conversas, por nunca deixar esquecer a importância de entender o porque das coisas e não somente a decorar protocolos e ressaltar a importância do senso crítico. Certamente todos esses momentos foram essenciais para minha formação profissional e pessoal.

Agradeço a minha orientadora Dra. Patrícia, pelo companheirismo no laboratório, amizade, risadas e conselhos sobre criação de cachorros. Sua ajuda em muitos momentos deste trabalho foi essencial. Se este trabalho hoje pode ser lido, isto também se deve à você que sempre foi muito prestativa e amiga.

A Débora, minha também orientadora, que esteve comigo desde os primeiros dias de laboratório até agora. Todos os ensinamentos foram de extrema importância. E todos os momentos de brincadeiras, piadas e risadas também. Agradeço-te por todas as vezes que te fazia uma pergunta e você me respondia “Vai pesquisar”, com certeza estes foram os momentos de maior aprendizado. Claro que não posso esquecer-me dos ensinamentos de química, tão importantes para mim. Mas acredito que a sua amizade nesse tempo foi para mim o mais importante, e espero que esta dure para sempre.

Aos meus pais, Marina e Jefferson, primeiro porque sem eles eu não estaria aqui, mas também pelas palavras de auxílio e incentivo que nunca faltaram!

A minha irmã Camila, que foi morar comigo justo no meu último ano de faculdade, o que a obrigou a aguentar meus estresses e ainda continuar me ajudando em tudo o possível. Por toda ajuda que você me deu mesmo nas coisas mais bobas as mais sérias, meu sincero obrigada.

Ao meu namorado Saulo, por toda a compreensão e paciência nos momentos difíceis, porém principalmente por todas

as piadas compartilhadas, frases completadas, pensamentos iguais, risadas e conversas. Obrigada por ser tão especial.

A todas as amigas e amigos do laboratório que fizeram de todos os dias de trabalho mais fáceis e prazerosos, Thaynara, Laís, Laryssa, Gustavo, Ana Paula G., Greicy, Ana Paula, Milene, Vagner. Obrigada pela amizade e ajuda. E também agradecer aqueles que já não estão mais presentes, mas que com certeza fizeram parte destes anos, Ninna, Elisa, Carolina, Glauber.

A minha segunda família da Biologia, com quem passei tantos momentos especiais e que estiveram comigo em todos os momentos bons e ruins, Beatriz, Renato, Priscila, Mariana, Thyago, Mayara e Ricardo. E a todos os outros amigos de curso, nunca me esquecerei de tudo que fizemos e passamos nesses anos de biologia.

À banca avaliadora deste trabalho, pela disposição e aceite do convite.

Ao CNPq, FINEP, CAPES e UFSC pelo incentivo financeiro.

Enfim, agradeço a todos que ajudaram de uma forma ou de outra com a realização deste trabalho.

*"We are all a little weird and life's a little weird.
And when we find someone whose weirdness is compatible with ours,
we join up with them and fall in mutual weirdness and call it love."
Dr. Seuss*

RESUMO

O *Trypanosoma rangeli* é um parasito hemoflagelado que infecta mamíferos silvestres e domésticos, assim como seres humanos. Compartilha reservatórios e vetores com *Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico da Doença de Chagas. Dentre as muitas proteínas cruciais no metabolismo de tripanosomatídeos, a enzima arginina quinase (AK), pertencente a uma família de proteínas conservadas com atividade de fosfotransferase (guanidino quinases), cataliza a interconversão entre a fosfoarginina e ATP, atuando como reguladora de reservas energéticas sob condições de estresse por falta de nutrientes. O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização biológica e molecular da proteína AK de *T. rangeli* (TrAK). A sequência do gene TrAK foi amplificada através de PCR, gerando um produto esperado de 1.070 pb. Após clonagem em vetor pGEM T-easy®, o sequenciamento do inserto confirmou sua identidade e revelou que o gene da AK de *T. rangeli* possui 89 % de similaridade com o gene ortólogo de *T. cruzi*. Visando a expressão heteróloga da TrAK, o gene foi sub-clonado em vetor de expressão pET-14b, sendo este utilizado na transformação de *E. coli* BL21(DE3) Codon plus. Após indução, detectou-se em SDS-PAGE a expressão de uma proteína de ~40 kDa nas frações solúvel e insolúvel do extrato bacteriano, tamanho este compatível ao esperado teórico. A proteína recombinante (rTrAK) foi purificada da fração solúvel (rendimento = 338 mg/l de cultura) e sua identidade confirmada por espectrometria de massas (Nano-LC ESI-MS/MS) com 74 % de cobertura. Camundongos C57BL/6 foram imunizados com rTrAK produzindo um antissoro anti-TrAK espécie-específico que foi capaz de reconhecer um polipeptídeo de 45 kDa no extrato proteico total de formas epimastigotas e tripomastigotas do *T. rangeli*, não reconhecendo nenhuma proteína em extratos de *T. cruzi*. Nos ensaios de citolocalização a TrAK pode ser encontrada principalmente em associação com o flagelo. Os ensaios apresentados neste trabalho mostraram que a proteína TrAK possui características similares a TcAK e a TbAK1, porém vale ressaltar que ensaios de atividade e outros

estudos subsequentes devem ser feitos para obtenção de maiores informações a respeito da atividade da enzima *TrAK*.

Palavras-chave: *Trypanosoma rangeli*, arginina quinase, fosfotransferase.

ABSTRACT

Trypanosoma rangeli is a hemoflagellate parasite that infects wild and domestic mammals, as well as the man. It shares hosts, reservoirs and vectors with *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. Among the proteins that are crucial in the metabolism of trypanosomatids, the enzyme arginine kinase (AK) belongs to a family of conserved proteins with phosphotransferase activity (guanidino kinases) and catalyzes the interconversion between phosphoarginine and ATP, acting as a manager of energy reserves under stress from lack of nutrients. Thus, the aim of this work was the molecular characterization of the protein AK from *T. rangeli* (*TrAK*). The *TrAK* gene sequence was amplified by PCR, generating an expected product of 1.070 bp. After cloning in pGEM T-easy® vector, sequencing confirmed the identity of the insert revealed that *T. rangeli* AK has 89 % similarity with the orthologous gene of *T. cruzi*. Targeting the expression of heterologous *TrAK*, the insert was sub-cloned into the expression vector pET -14b, which is used in the transformation of *E. coli* BL21 (DE3) Codon Plus. After induction, the expression of a protein of ~40 kDa in soluble and insoluble fractions was detected in SDS-PAGE, the theoretical expected size. The recombinant protein (r*TrAK*) was purified from the soluble fraction (yield = 338 mg/l of bacterial culture) and has its identity confirmed by mass spectrometry (nano-LC ESI-MS/MS) (74 % coverage). C57BL / 6 mice were immunized with r*TrAK* producing an anti-*TrAK* species-specific antiserum that was able to recognize a polypeptide of 45 kDa in total protein extract of epimastigotes and trypomastigotes of *T. rangeli*, and it does not recognize any protein in extracts of *T. cruzi*. In the tests of the subcellular location, the *TrAK* can be found mainly in association with the flagellum. The tests presented in this work showed that the protein *TrAK* has similar characteristics to *TcAK* and *TbAK1*, but it is noteworthy that testing activity and other subsequent studies should be made to obtain more information about the activity of the enzyme *TrAK*.

Key-words: *Trypanosoma rangeli*, Arginine Kinase, phosphotransferase.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP – Adenosina Difosfato

ATP – Adenosina Trifosfato

BLAST – do inglês *Basic Local Alignment Search Tool*

CG – meio *Cyrcle Grow*

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DNA – ácido desoxiribonucleico

dNTP – desoxinucleotídeos trifosfatados

g – força da gravidade

His – referente ao aminoácido histidina (H)

IgG – anticorpo do tipo Imunoglobulina G

IPTG – isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

l – litro

LB – meio Luria-Bertani

LIT – do inglês *Liver Infusion Triptose*

ml – mililitro

mM – milimolar

ng – nanograma

OGM – Organismo Geneticamente Modificado

ORF – do inglês *Open Reading Frame*

pb – pares de bases

PCR – do inglês *Polymerase Chain Reaction*

pmol – picomol

RNA – ácido ribonucleico

SBF – Soro Bovino Fetal

TA – Temperatura Ambiente

Taq – *Thermus aquaticus*

TbAK - Arginina quinase de *T. brucei*

TcAK – Arginina quinase de *T. cruzi*

TrAK - Arginina quinase de *T. rangeli*

U – unidade de atividade

V – Volt

X-Gal – 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactose

μ g – micrograma

μ l – microlitro

W – Watt

SUMÁRIO

1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
1.1	<i>Trypanosoma rangeli</i>	21
1.2	A proteína arginina quinase	27
2	JUSTIFICATIVA.....	31
3	OBJETIVO GERAL.....	33
3.1	Objetivos Específicos.....	33
4	METODOLOGIA.....	35
4.1	Parasitos	35
4.1.1	Cultivo <i>in vitro</i> das formas epimastigotas.....	35
4.1.2	Diferenciação <i>in vitro</i> para obtenção das formas tripomastigotas de <i>T. rangeli</i>	36
4.1.3	Obtenção de formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> cepa Y.....	36
4.2	Clonagem do gene da arginina quinase de <i>T. rangeli</i>	37
4.2.1	Extração de DNA genômico	37
4.2.2	Amplificação e clonagem do gene da arginina quinase.....	37
4.2.3	Extração do DNA plasmidial e digestão com enzimas de restrição	38
4.2.4	Sequenciamento do inserto no vetor de clonagem.....	39
4.2.5	Análise das sequências obtidas.....	40
4.2.6	Construção dos plasmídeos para expressão heteróloga.....	40

4.2.7	Ligação do inserto no vetor de expressão	40
4.3	Expressão heteróloga da arginina quinase	41
4.3.1	Indução da expressão	41
4.3.2	Determinação da solubilidade	42
4.3.3	Detecção da expressão heteróloga	42
4.4	Purificação e quantificação da arginina quinase recombinante	43
4.4.1	Purificação da proteína de interesse	43
4.4.2	<i>Western Blot</i>	43
4.4.3	Quantificação da proteína purificada	44
4.5	Espectrometria de massas	44
4.5.1	Digestão das proteínas <i>in-gel</i>	44
4.5.2	Análise por LC-ESI-MS/MS	45
4.5.3	Identificação das proteínas	45
4.6	Obtenção do antissoro dirigido a arginina quinase	45
4.6.1	Animais	45
4.6.2	Imunização dos camundongos com a proteína arginina quinase recombinante	46
4.7	Reatividade do soro policlonal contra proteínas arginina quinase	46
4.7.1	Extração de proteína dos parasitos	46
4.7.2	Detecção da expressão de proteínas arginina quinase por <i>Western Blot</i>	47
4.7.3	Avaliação dos níveis de expressão através do programa <i>ImageJ</i>	47

4.7.4	Citocalização por ensaios de imunofluorescência	47
5	RESULTADOS.....	49
5.1	Amplificação, clonagem e análise da sequência do gene da arginina quinase de <i>T. rangeli</i>	49
5.2	Expressão heteróloga e purificação da arginina quinase	53
5.3	Reatividade do soro policlonal contra proteínas arginina quinase	56
5.3.1	Detecção da expressão de proteínas arginina quinase por <i>Western Blot</i>	57
5.3.2	Localização celular da <i>TrAK</i> por imunofluorescência	59
6	DISCUSSÃO.....	63
7	CONCLUSÕES.....	69
8	PERSPECTIVAS.....	71
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 *Trypanosoma rangeli*

O *Trypanosoma rangeli* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), descrito por Tejera em 1920, é um parasito hemoflagelado capaz de infectar animais selvagens e domésticos, além do homem, nas Américas Central e do Sul. O *T. rangeli* apresenta duas formas biológicas bem definidas no seu ciclo de vida: a forma epimastigota proliferativa com 45 a 56 μm de comprimento, incluindo o flagelo livre, e a forma tripomastigota sanguínea (Figura 1), a qual é delgada e possui comprimento de 26 a 35 μm (CUBA CUBA, 1998).



Figura 1. Microfotografia de formas A) epimastigotas e B) tripomastigotas sanguíneas de *Trypanosoma rangeli*, coradas por Giemsa. As barras de aumento representam 10 μm . Fonte: Débora Denardin Lückemeyer, MSc.

Sua distribuição geográfica é sobreposta à do *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, com o qual compartilha reservatórios e vetores (Figura 2). As implicações epidemiológicas da coexistência destes dois parasitos estão na ocorrência de infecções únicas ou mistas, tanto nos hospedeiros insetos como nos mamíferos

(D'ALESSANDRO, 1976; GRISARD et al., 1999; GRISARD & STEINDEL, 2005).



Figura 2. Distribuição geográfica do *Trypanosoma cruzi* (doença de Chagas) e pontos de ocorrência do *Trypanosoma rangeli*. Mapa das Américas Central e do Sul, mostrando a sobreposição geográfica da doença de Chagas humana (sombreado) e dos registros de ocorrência comprovada do *T. rangeli* em humanos, triatomíneos ou animais silvestres (□). Fonte: GRISARD & STEINDEL, 2005.

O *T. rangeli* não apresenta especificidade de hospedeiros, sendo encontrado em uma extensa variedade de reservatórios mamíferos, correspondentes as Ordens Edentata, Marsupialia, Carnivora, Rodentia e Primata (D'ALESSANDRO & SARAIVA, 1999). Experimentalmente, diferentes espécies, que incluem ratos, camundongos, hamsters, coelhos, cães, morcegos e primatas foram infectadas com *T. rangeli*, comprovando sua possível amplitude de hospedeiros (GUHL & VALLEJO, 2003).

Em relação ao hospedeiro invertebrado, o gênero *Rhodnius* é particularmente susceptível à infecção pelo *T.*

rangeli, embora *Panstrongylus megistus*, e espécies do gênero *Triatoma* também tenham sido descritos como susceptíveis à infecção por *T. rangeli* (DE STEFANI MARQUEZ et al., 2006). As espécies de triatomíneos naturalmente infectadas pelo *T. rangeli* pertencem ao gênero *Rhodnius*. Entretanto, a susceptibilidade e o nível de infecção varia conforme a espécie do triatomíneo e a cepa do parasito, já tendo sido descrita uma relação entre a espécie do triatomíneo com as cepas do parasito que ocorrem na mesma região geográfica. Estas cepas são divididas em duas linhagens, sendo denominadas KP1(+) e KP1(-), de acordo com a presença ou ausência de uma região conservada nos minicírculos, que consistem em arranjos circulares concatenados de DNA presentes no cinetoplasto, região terminal da única mitocôndria encontrada nos parasitos da Ordem Kinetoplastida (GUHL; VALLEJO, 2003). Outro fator relevante é que as taxas de infecção das glândulas salivares e hemolinfa são maiores em condições experimentais do que aquelas observadas em condições naturais (D'ALESSANDRO, 1969).

Mesmo sendo muito relacionado ao *T. cruzi*, em aspectos epidemiológicos, filogenéticos, e morfológicos, o *T. rangeli* não é considerado patogênico para seus hospedeiros mamíferos. Este parasito é capaz de induzir uma resposta imune humoral com elevados títulos de anticorpos, os quais determinam uma elevada reatividade cruzada com o *T. cruzi*, uma vez que suas formas epimastigotas compartilham cerca de 60 % da sua constituição antigênica solúvel. Este fato pode levar a diagnósticos falso-positivos da doença de Chagas, especialmente em sua fase crônica. Desta forma, o *T. rangeli* é de considerável interesse médico e de extrema importância em estudos epidemiológicos da doença de Chagas (AFCHAIN et al, 1979; SCHOTTELIUS, 1987; GRISARD et al., 1999). Embora diferentes técnicas laboratoriais sejam empregadas atualmente para o diagnóstico da doença de Chagas, incluindo métodos parasitológicos diretos e/ou indiretos, somente poucos métodos ou técnicas especializadas podem indubitavelmente diferenciar *T. cruzi* de *T. rangeli*, não estando estas disponíveis para o diagnóstico de rotina (STEINDEL et al., 1994; GRISARD, et al., 1999; SUÁREZ, CUERVO, PUERTA, 2007).

O ciclo de vida do *T. rangeli* é complexo, envolvendo distintas fases com expressivas diferenças morfológicas e funcionais (Figura 3). O hospedeiro invertebrado (triatomíneo) é infectado pelo parasito em sua forma tripomastigota sanguínea, através da ingestão durante a hematofagia. No triatomíneo, o *T. rangeli* diferencia-se em epimastigota e inicia sua multiplicação, colonizando o trato intestinal do inseto. Após alguns dias de infecção, as formas epimastigotas aderem-se ao epitélio do intestino médio e o atravessam, chegando à hemocele. Quando na hemolinfa, os epimastigotas mais uma vez multiplicam-se e migram para a glândula salivar do inseto. Ao invadirem a glândula salivar, diferenciam-se em formas tripomastigotas metacíclicas, as formas infectantes para os mamíferos, sendo inoculadas quando realizada a hematofagia (GRISARD, STEINDEL, 2005).

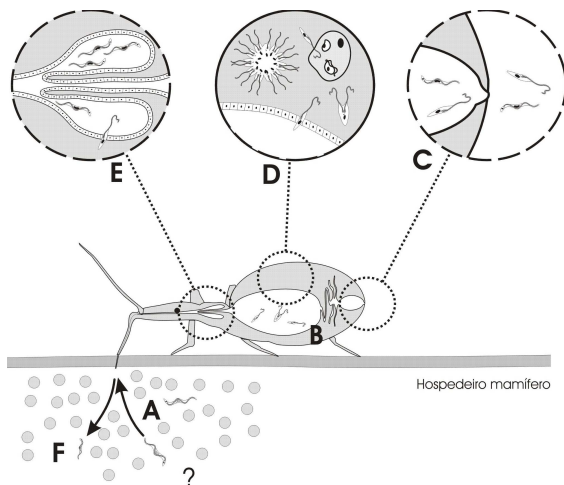


Figura 3. Ciclo de vida do *Trypanosoma rangeli* no hospedeiro invertebrado. (A) Ingestão de tripomastigotas de *T. rangeli* durante o repasto, (B) Formas tripomastigotas e epimastigotas no intestino do triatomíneo, (C) Parasitos que alcançaram a ampola retal, sendo assim possível que formas tripomastigotas e epimastigotas sejam excretadas com as fezes e urina, (D) Adesão dos parasitos na parede intestinal e transposição para a hemocele, (E) Invasão das glândulas salivares e

diferenciação para formas infectantes (F) inoculação de tripomastigotas metacíclicos durante o repasto sanguíneo. Fonte: GRISARD; STEINDEL, 2005.

O ciclo biológico do *T. rangeli* é pouco conhecido a partir do momento em que o parasito alcança a circulação sanguínea do hospedeiro mamífero. A multiplicação intracelular neste hospedeiro ainda é controversa, faltando evidências para postular uma hipótese (HERBIG-SANDREUTER, 1955). Existem relatos de que a multiplicação no hospedeiro mamífero do *T. rangeli* esteja relacionada às características da cepa utilizada. Porém, muitos pesquisadores têm procurado, ainda sem êxito, por formas deste parasito em tecidos de animais experimentalmente infectados (GUHL, VALLEJO, 2003). O *T. rangeli* apresenta parasitemias normalmente baixas e de curta duração (D'ALESSANDRO, SARAIVA, 1999). A taxa de infectividade de diferentes cepas deste parasito frente a diferentes linhagens celulares é geralmente muito baixa e os parasitos tendem a desaparecer ao longo do tempo de interação, sugerindo a ausência de multiplicação intracelular (EGER-MANGRICH et al., 2001).

1.2 A proteína arginina quinase

Os tripanosomatídeos compartilham características do metabolismo energético de eucariotos, entretanto possuem características únicas que os diferenciam de seus hospedeiros (TIELENS & HELLEMOND, 1998). Considera-se que estas diferenças evoluíram a partir da fonte de nutrientes disponível nos ambientes no qual cada tripanosomatídeo estava presente (GINGER, 2006).

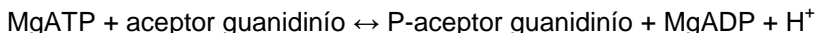
Os tripanosomatídeos possuem um complexo ciclo de vida que envolve uma diversidade de ambientes com variada composição, desde propriedades físico-químicas à disponibilidade de nutrientes. Com as mudanças de ambiente existe uma necessidade de manutenção da homeostase dos nucleosídeos, o que requer uma resposta regulatória rápida. A maioria das enzimas necessárias para esta gestão de energia são as fosfotransferases. Estas enzimas apresentam um grupamento nitrogênio ou fosfato como aceptores, e os exemplares mais comuns são a arginina quinase, nucleosídeo difosfato quinase e adenilato quinase (PEREIRA et al., 2011).

A arginina quinase (AK) pertence a uma família de proteínas conservadas com atividade de fosfotransferase, as guanidino quinases, sendo a creatina quinase o membro mais bem conhecido (ALONSO et al., 2001). É uma fosfotransferase que catalisa a interconversão entre a fosfoarginina e ATP (CANEPA et al., 2011).

Fosfoarginina e fosfocreatina, geralmente denominadas de fosfogênes, desempenham um papel de extrema importância como reserva de energia, pois o fosfato de alta energia pode ser transferido para adenosina difosfato (ADP) quando a renovação da adenosina trifosfato (ATP) se faz necessária (PEREIRA et al., 2011).

A arginina quinase desempenha um papel crítico como reserva de energia, pois o fosfato de alta energia pode ser transferido para o difosfato de adenosina (ADP), quando a renovação do trifosfato de adenosina (ATP) é necessária (PEREIRA et al., 2011). Essa enzima catalisa a transferência reversível de um grupo fosforil de um ATP para umceptor

guanidínio, o qual pode ser tanto um aminoácido (ex. arginina) ou um carboxilato (ex. creatina) (PEREIRA et al., 2000), conforme a reação abaixo:



O sistema de tamponamento de ATP baseado em fosfogènes mantém a homeostase de ATP durante a alta e flutuante demanda de energia celular. A fosfoarginina é a principal reserva de compostos de fosfato de alta energia em uma grande variedade de invertebrados, enquanto em vertebrados foi encontrada somente a fosfocreatina (MIRANDA et al., 2009). Tem sido proposto que a fosfoarginina suporta rompantes de atividade celular, até mesmo de eventos catabólicos, tais como a glicólise, glicogenólise e a fosforilação oxidativa (ALONSO et al., 2001).

A síntese de fosfoarginina também permite que as células operem com níveis baixos de ATP, uma vez que podem constituir um conjunto utilizável de fosfato de alta energia. Fosfogènes agem como reservatórios, não somente de ATP, mas também de fosfato inorgânico que é devolvido ao meio em grande parte pelo consumo metabólico do ATP (PEREIRA et al., 2011).

Esta enzima é largamente distribuída entre organismos tais como artrópodes, moluscos, nematoides, cnidários, poríferos, protozoários (ciliados e coanoflagelados) e bactérias, o que indica sua origem ancestral. Porém, arginina quinases são ausentes em vertebrados (CANEPA et al., 2011). Do ponto de vista evolutivo, a arginina quinase foi incluída numa família de proteínas conservadas com atividade de fosfotransferase, juntamente com a creatina quinase, seu membro mais conhecido. Além disso, esta fosfotransferase é ausente em mamíferos, sendo um possível alvo para desenvolvimento futuro de agentes quimioterápicos contra a doença de Chagas e outras parasitoses causadas por organismos relacionados (PEREIRA et al., 2000).

Já se sabe que em epimastigotas de *T. cruzi*, a arginina quinase possui sua atividade aumentada durante a fase exponencial de crescimento. Os processos que mais demandam

energia em tripanosomatídeos patogênicos são a divisão celular, motilidade, estágio de diferenciação e invasão de células do hospedeiro. Condições nutricionais durante o ciclo de vida do *T. cruzi* também impõem restrição de disponibilidade de energia. No hospedeiro mamífero os estágios tripomastigotas e amastigotas se beneficiam de um ambiente praticamente constante, incluindo um suprimento estável de glicose e aminoácidos; ao contrário do que acontece no inseto vetor, onde o estado alimentar determina variações na disponibilidade de nutrientes para as formas epimastigotas (ALONSO et al., 2001).

No *Trypanosoma cruzi*, duas isoformas diferentes de arginina quinase foram identificadas, porém apenas uma é expressa durante o ciclo de vida do parasito (MIRANDA et al., 2009). A proteína correspondente possui 357 aminoácidos e um peso molecular calculado em 40 kDa (PEREIRA et al., 2003).

Esta enzima apresenta uma extraordinária homologia aminoacídica comparada com aquelas presentes em crustáceos e insetos, sendo que a origem evolucionária desta sequência está em discussão. Especula-se que possa ter havido algum tipo de transferência genética horizontal entre artrópodes e tripanosomatídeos durante a evolução (PEREIRA et al., 2000).

Múltiplas evidências indicam que a arginina quinase de *T. cruzi* é altamente regulada por condições intra e extracelulares: (1) a proteína arginina quinase e a atividade específica associada aumentam continuamente ao longo da curva de crescimento de epimastigotas, sugerindo uma correlação entre a atividade enzimática e a disponibilidade de nutrientes ou densidade parasitária; (2) a existência de uma relação entre a taxa de transporte de arginina, a atividade da arginina quinase, a fase do parasita e a capacidade de replicação foi recentemente descrita, indicando o papel crítico da arginina quinase como um regulador das reservas energéticas e crescimento celular; (3) a super-expressão da arginina quinase de *T. cruzi* melhora a capacidade de crescimento e resistência a condições de estresse nutricional e de pH das células transfectadas (PEREIRA et al., 2011). Neste sentido, a arginina quinase foi proposta como uma reguladora de reservas energéticas sob condições de estresse por falta de nutrientes neste parasito (PEREIRA et al., 2002).

Parasitos super-expressando a arginina quinase também demonstraram significativo aumento da capacidade de sobrevivência durante exposição à estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio. Estes resultados sugerem a participação da arginina quinase no sistema de resposta ao estresse oxidativo (PEREIRA et al., 2011).

2 JUSTIFICATIVA

Diante da importância da arginina quinase no ciclo de vida de tripanosomatídeos, como o *T. cruzi*, e da presença já detectada desta proteína em *T. rangeli* em um estudo que está sendo desenvolvido no Laboratório de Protozoologia, o presente estudo visa aprofundar os estudos da arginina quinase de *T. rangeli*. Uma vez que o *T. rangeli* não é patogênico para o hospedeiro mamífero, apontar as similaridades e/ou diferenças entre as proteínas arginina quinase de *T. cruzi* e *T. rangeli* pode contribuir na compreensão do ciclo celular do *T. rangeli* nos seus hospedeiros mamíferos além de permitir estudos funcionais da participação desta proteína no ciclo de vida do parasito.

Um último ponto está relacionado com implicações terapêuticas da arginina quinase, pois esta quinase não está presente nos tecidos dos mamíferos. Desta forma, torna-se um alvo possível para o futuro desenvolvimento de agentes quimioterápicos contra a doença de Chagas e outras doenças parasitárias causadas por organismos relacionados (PEREIRA et al., 2000). Este ponto, correlacionado com o fato da arginina quinase de *T. rangeli* não ser conhecida, reveste de importância o estudo desta proteína para que se possa verificar as diferenças significativas entre as arginina quinases de *T. cruzi* e *T. rangeli*, através da análise comparativa.

3 OBJETIVO GERAL

Caracterizar molecularmente a proteína arginina quinase de *Trypanosoma rangeli*.

3.1 Objetivos Específicos

- Amplificar, clonar e obter a sequência do gene da arginina quinase da cepa Choachí de *T. rangeli*;
- Realizar a expressão heteróloga do gene da arginina quinase, purificar a proteína recombinante e produzir antissoro murino dirigido à proteína arginina quinase de *T. rangeli*;
- Avaliar os níveis de expressão da arginina quinase nas formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli*.
- Determinar a citolocalização da arginina quinase através de ensaios de imunofluorescência.

4 METODOLOGIA

Em síntese, a amplificação do gene da arginina quinase da cepa Choachí de *T. rangeli* foi realizada a partir de DNA genômico do parasito. Para tanto, o DNA foi extraído e submetido a uma reação de PCR para a amplificação do gene. O produto dessa reação foi clonado, sequenciado e, após confirmação da identidade do gene, foi utilizado para inserção em vetor específico para expressão em bactérias *Escherichia coli*.

A proteína arginina quinase recombinante obtida foi purificada e utilizada para a imunização de camundongos para obtenção de soro policlonal. A expressão da arginina quinase e a reatividade do soro policlonal a essa proteína foi confirmada através de ensaios de *Western Blot* e imunofluorescência.

4.1 Parasitos

4.1.1 Cultivo *in vitro* das formas epimastigotas

Nesse estudo foram utilizadas as cepas Choachí de *T. rangeli* (SCHOTTELIUS, 1987) originalmente isolada de *R. prolixus* naturalmente infectado, capturado na Colômbia, assim como a cepa SC58 de *T. rangeli*. A cultura de formas epimastigotas foi realizada em meio LIT (do inglês, *Liver Infusion Tryptose*) suplementado com 10 % de soro bovino fetal (SBF, Gibco), 50 U/ml de penicilina e 50 µg/ml de estreptomicina (Cultilab, Campinas) a 27 °C através de passagens semanais. A cepa original foi previamente submetida à passagem em triatomíneos e camundongos a fim de garantir suas características biológicas originalmente descritas.

Formas epimastigotas das cepas Y e Colombiana de *T. cruzi*, utilizadas como controle nos experimentos, também foram cultivadas em meio LIT suplementado com 10 % de SBF a 27 °C através de passagens semanais.

Todas as cepas utilizadas encontram-se depositadas no criobanco do Laboratório de Protozoologia (MIP/CCB/UFSC).

4.1.2 Diferenciação *in vitro* para obtenção das formas tripomastigotas de *T. rangeli*

As formas tripomastigotas foram obtidas a partir das formas epimastigotas de *T. rangeli* utilizando o protocolo descrito por Koerich et al. (2002) com algumas modificações. Inicialmente, 12×10^7 epimastigotas em fase exponencial de crescimento em meio LIT foram centrifugados por 10 minutos a $3.000 \times g$ e lavados duas vezes com PBS (tampão salina fosfato pH 7,4). Em seguida, foram adicionados 15 ml de meio DMEM (do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Himedia), pH 8,0 contendo 5 % de SBF e 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich) e mantidos a 27 °C em garrafas de cultura celular de 25 cm³ sem filtro (Corning). O processo de diferenciação foi acompanhado através da quantificação dos parasitos por contagem direta em câmara de Neubauer e da visualização em microscópio óptico após coloração dos parasitos com Giemsa (Merck). As formas tripomastigotas foram obtidas entre o 7º e 8º dia de cultivo, sendo coletadas por centrifugação quando taxas maiores que 95 % de tripomastigotas foram encontradas.

4.1.3 Obtenção de formas tripomastigotas de *T. cruzi* cepa Y

Para a obtenção de formas tripomastigotas de *T. cruzi* cepa Y foram utilizadas células Vero (fibroblasto de rim de macaco da espécie *Cercopithecus aethiops sabaeus*). As células foram cultivadas em meio DMEM, suplementado com 5 % de SBF a 37 °C com 5 % de CO₂ e atmosfera umedecida através de passagens semanais ou quando atingirem confluência celular. As monocamadas de células foram infectadas com formas tripomastigotas de cultura da cepa Y de *T. cruzi* previamente congeladas e estocadas no criobanco do Laboratório de Protozoologia. Após 72 horas de infecção, as formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram obtidas do sobrenadante das

culturas a sendo centrifugadas por 10 minutos a 4.000 x *g* e lavadas duas vezes com PBS pH 7,4 antes dos ensaios subsequentes.

4.2 Clonagem do gene da arginina quinase de *T. rangeli*

4.2.1 Extração de DNA genômico

Para a extração do DNA, formas epimastigotas da cepa Choachí de *T. rangeli* em fase exponencial de crescimento foram centrifugadas a 3.000 x *g* e lavadas duas vezes com PBS pH 7,2. Em seguida foram eluídas em tampão de lise (100 mM Tris-HCl pH 7,4, 10 mM NaCl, 25 mM EDTA pH 8,0, 1 % SDS), utilizando cerca de quatro vezes o volume do precipitado acrescido de Proteinase K (100 µg/ml) por 12 horas a 37 °C. As etapas subsequentes foram realizadas através do método de fenol-clorofórmio, de acordo com protocolo padrão (SAMBROOK & RUSSELL, 2001).

As amostras de DNA obtidas foram dosadas e avaliadas quanto a sua pureza através de espectrofotometria em equipamento BioPhotometer® (Eppendorf), observando-se a absorbância a 260 e a 280 nm, além das relações 260/280 nm e 260/230 nm. As amostras extraídas foram também visualizadas em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídio, sendo os resultados registrados digitalmente.

4.2.2 Amplificação e clonagem do gene da arginina quinase

Utilizando o programa Primer Select do pacote DNASTAR® (Lasergene), foram desenhados iniciadores específicos para amplificar a região codificante do gene da arginina quinase com base nas sequências nucleotídicas disponíveis no banco de dados GenBank e no transcriptoma do *T. rangeli* (GRISARD, et al., 2010). Os iniciadores senso e antisenso contêm em sua extremidade 5' sítios de clivagem das enzimas de restrição *Nde*I e *Xho*I, respectivamente, para a

subsequente inserção, na fase correta de leitura do gene, no vetor de expressão pET-14b (Novagen).

A amplificação via PCR foi primeiramente padronizada avaliando-se diferentes concentrações de DNA, sendo utilizadas as concentrações de 10 ng, 30 ng e 50 ng. Também foram avaliadas para a padronização da amplificação via PCR as faixas de pH e concentrações de cloreto de potássio (KCl) e cloreto de magnésio ($MgCl_2$) do tampão, assim como diferentes temperaturas de ligação dos iniciadores. O resultado da PCR foi observado após uma eletroforese em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídio.

O produto de PCR obtido foi clonado utilizando o kit pGEM-T easy[®] Vector (Promega), segundo as especificações do fabricante. Os produtos de ligação foram utilizados na transformação de células eletrocompetentes DH5- α (*E. coli*). A seleção dos clones recombinantes foi baseada na coloração azul/branco das colônias crescidas em meio CG (do inglês, *Cyrcle Grow*) contendo ágar e suplementado com ampicilina (100 $\mu g/ml$), X-Gal (20 $\mu g/ml$) e IPTG (40 $\mu g/ml$). Para a confirmação de que o inserto se trata do gene da arginina quinase, foi realizada uma PCR diretamente das colônias selecionadas, utilizando os mesmos iniciadores utilizados na amplificação do gene da arginina quinase a partir do DNA genômico de *T. rangeli*.

4.2.3 Extração do DNA plasmidial e digestão com enzimas de restrição

Os clones selecionados foram crescidos a 37 °C sob agitação por 15 horas em 10 ml de meio LB contendo ampicilina (100 $\mu g/ml$). Decorrido o tempo de crescimento, os plasmídeos recombinantes foram extraídos através de um procedimento padrão de lise alcalina, denominado *mini-prep*, conforme descrito por Sambrook e Russel (2001). O plasmídeo de expressão pET-14b, contido em bactérias *E. coli* da cepa BL21(DE3), foi extraído através da mesma técnica.

4.2.4 Sequenciamento do inserto no vetor de clonagem

Com o objetivo de confirmar a presença e a identidade do inserto arginina quinase no vetor de clonagem pGEM-T easy[®], o sequenciamento dos insertos foi realizado, com o auxílio da Dra. Patrícia Hermes Stoco, utilizando o kit *BigDYE 3.1* (Applied Biosystems), conforme as instruções do fabricante, e a leitura das bases foi realizada em um equipamento *abi3500* (Applied Biosystems). A reação de sequenciamento foi realizada na presença de 5 pmol de cada um dos iniciadores M13 F (5' – CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC – 3') e M13 R (5' – TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA C – 3') direcionados para a sequência do vetor, e aproximadamente 2 µg de DNA plasmidial, nas seguintes condições térmicas: 96 °C por 1 minuto, seguidos de 35 ciclos com desnaturação de 96 °C por 1 segundo, ligação dos iniciadores a 50 °C por 5 segundos e extensão a 60 °C por 4 minutos. Os produtos dessa reação foram completados para volume final da reação de 10 µl com água ultrapura autoclavada. A retirada de iniciadores e nucleotídeos não incorporados foi realizada através de precipitação adicionando-se EDTA 125 mM, e etanol 100 %, seguido por homogenização e centrifugação de 45 minutos a 4.000 x g, sendo posteriormente lavados com etanol 70 % e adicionados de formamida Hi-Di (Applied Biosystems) e, subsequentemente, eletroinjetados de acordo com recomendações do fabricante.

Com o objetivo de confirmar a presença do inserto arginina quinase no vetor de expressão pET-14b e verificar se o mesmo encontrava-se na fase correta de leitura, o sequenciamento dos insertos foi feito conforme descrito acima, onde apenas foram alterados os iniciadores, sendo então usados os iniciadores T7 F (5' – TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG – 3') e T7 R (5' – GCT AGT TAT TGC TCA GCG G – 3'), direcionados para sequências do vetor pET-14b.

É importante salientar que os procedimentos envolvendo a geração e a manipulação de OGM foram realizados em áreas incluídas no Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB) da UFSC e com a aprovação da CIBio/UFSC e da CTNBio.

4.2.5 Análise das sequências obtidas

A qualidade e o agrupamento das sequências foram determinados utilizando-se o programa *Phred* do pacote *Phred/Phrap/Consed* (EWING et al., 1998; EWING & GREEN, 1998), onde cada nucleotídeo sequenciado recebe um valor de qualidade dado pela fórmula $q = -10 \log_{10}(p)$ onde q e p correspondem, respectivamente, ao valor de qualidade e à probabilidade de erro de uma determinada base (EWING; GREEN, 1998). O valor mínimo de qualidade estipulado para as sequências nucleotídicas foi de *Phred* ≥ 20 .

A confirmação da identidade do fragmento obtido foi realizada através da ferramenta *blastx* (ALTSCHUL et al., 1990) do algoritmo BLAST do GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A sequência também foi traduzida nas seis possíveis fases de leitura através do programa Translate (www.expasy.org) e analisada quanto à presença da cauda de histidinas e à existência de códons de terminação. Os alinhamentos comparativos foram realizados utilizando o programa *BioEdit* (Lasergene) e também o algoritmo BLAST do GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4.2.6 Construção dos plasmídeos para expressão heteróloga

O vetor pET-14b íntegro e o plasmídeo pGEM-T easy[®] contendo o inserto da arginina quinase foram submetidos à digestão com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI* (BioLabs). A digestão transcorreu a 37°C por aproximadamente 12 horas e, uma vez concluída, as amostras foram submetidas a uma eletroforese em gel de agarose 1 % e as bandas de interesse foram excisadas do gel e purificadas utilizando-se o kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare), segundo as especificações do fabricante.

4.2.7 Ligação do inserto no vetor de expressão

O gene da arginina quinase foi inserido no vetor de

expressão pET-14b devido às extremidades coesivas de ambas as sequências, decorrentes da digestão com as mesmas enzimas de restrição. A ligação ocorreu na presença da enzima T4 DNA ligase (BioLabs), e os produtos de ligação foram utilizados na transformação de células eletrocompetentes BL21 (DE3), BL21 (DE3) plysS e BL21 (DE3) *Codon plus* (*E. coli*). Novamente, a seleção dos clones recombinantes foi realizada através de PCR utilizando DNA molde diretamente das colônias, sendo os clones positivos posteriormente submetidos à extração DNA plasmidial pela técnica de lise alcalina (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

4.3 Expressão heteróloga da arginina quinase

4.3.1 Indução da expressão

As células BL21(DE3) contendo o inserto da arginina quinase no plasmídeo pET-14b foram mantidas em placas de Petri com meio LB ágar suplementado com ampicilina (100 µg/ml), enquanto as células BL21 (DE3) plysS e BL21 (DE3) *Codon plus* tiveram seus meios de cultura também suplementados com 34 mg/ml de cloranfenicol. Para expressão da proteína, as bactérias recombinantes BL21(DE3) foram cultivadas por 15 horas a 37°C sob agitação em 10 ml de meio LB líquido contendo ampicilina (100 µg/ml). Deste pré-inóculo, 3 ml foram adicionados a 27 ml do mesmo meio e o crescimento se deu a 37°C sob agitação, até a densidade óptica a 600 nm (D.O._{600 nm}) atingir o valor de 0,6 em leitura espectrofotométrica num equipamento BioPhotometer® (Eppendorf). Encerrado o tempo de crescimento, uma alíquota da cultura foi separada previamente à indução da expressão para servir como controle não induzido, e ao restante foram acrescentados 30 µl de IPTG (200 mg/ml) para uma concentração final de 1 mM. No intuito de padronizar o crescimento ótimo das bactérias, associado à expressão da arginina quinase, as culturas induzidas foram cultivadas nas temperaturas de 27°C e 37°C por três horas e seis horas sob agitação. Após o término de cada crescimento, as culturas foram centrifugadas a 5.000 x g por 10 minutos. O

sobrenadante foi descartado e o precipitado congelado a -20°C. Os precipitados de cada tempo de crescimento e temperatura foram eluídos com PBS e adicionado tampão de amostra para SDS-PAGE (20 % glicerol, 0,5 % azul de bromofenol, 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 4,4 % SDS e 2 % β -mercaptoetanol). As amostras foram fervidas e resolvidas em eletroforese (SDS-PAGE 10 %), para avaliação da presença ou não de uma banda proeminente de tamanho compatível com o tamanho da proteínas de interesse nas amostras pós-indução.

4.3.2 Determinação da solubilidade

Após a seleção das condições de melhores resultados de expressão da proteína, novas culturas foram induzidas e aos precipitados foram adicionados 1,5 ml de PBS e os mesmos foram submetidos a sonicação em 10 ciclos de 30 segundos na potência de 12 W em equipamento *Sonic Dismembrator Fisher Scientific* Modelo FB120 com 30 segundos de intervalo em banho de gelo. Após a sonicação, a amostra foi centrifugada a 4°C por 30 minutos a 12.000 x g. O sobrenadante foi separado e o precipitado foi acrescido de SDS 10 %. Este procedimento foi realizado para determinar se a arginina quinase encontra-se na fração solúvel ou insolúvel do lisado de células.

4.3.3 Detecção da expressão heteróloga

Alíquotas contendo 5 μ l de cada amostra foram misturadas a 5 μ l de tampão de amostra SDS-PAGE. As amostras foram então submetidas à desnaturação a 95°C por cinco minutos e, em seguida, à separação eletroforética em sistema *Mini-PROTEAN® Tetra Cell* (BioRad). Em cada gel também foi aplicado um padrão de tamanho molecular *Benchmark™ Protein Ladder* (Invitrogen) como parâmetro de comparação. O gel foi corado com azul de Coomassie R250 0,25 % e sua imagem digitalizada em equipamento *Perfection 4990 Scanner®* (Epson, Suwa).

4.4 Purificação e quantificação da arginina quinase recombinante

4.4.1 Purificação da proteína de interesse

A purificação das proteínas recombinantes foi realizada através da lise pela adição de 10 ml de tampão de lise (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM de NaCl, 10 mM de Imidazol, pH 8,0) juntamente com 20 μl de lisozima (50 mg/ml), sendo a amostra sonicada em 10 ciclos de 30 segundos na potência de 12 W em equipamento *Sonic Dismembrator Fisher Scientific* Modelo FB120 com 30 segundos de intervalo em banho de gelo. Após a sonicação foram adicionados 75 μl de RNase. O material lisado foi centrifugado a 4°C por 30 minutos a 12.000 x g e o sobrenadante imobilizado em 600 μl do suporte Ni-NTA agarose (Qiagen, Dusseldorf), conforme instruções do fabricante. Foram realizadas as lavagens do suporte e eluição da proteína utilizando-se o tampão de lavagem (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM de NaCl, 20 mM de Imidazol, pH 8,0) e o tampão de eluição (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM de NaCl, 250 mM de Imidazol, pH 8,0). O suporte foi lavado três vezes com 10 ml do tampão de lavagem e a proteína liberada em cinco etapas de adição de 600 μl do tampão de eluição. Para a diminuição da concentração de sais, as eluições foram dialisadas duas vezes a 4°C em tampão de diálise (50 mM NaH_2PO_4 , 150mM de NaCl, pH 8,0).

4.4.2 Western Blot

Extratos totais de *E. coli* não transformadas e expressando a proteína recombinante foram resolvidas por um gel SDS-PAGE 10 % e transferidas para membranas de nitrocelulose (*Hybond-ECL – GE Healthcare*) durante 3 horas a 100 V, conforme descrito por Towbin e colaboradores (1979). Posteriormente, a membrana foi bloqueada em tampão de *blotting* (150 mM de NaCl; 25 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 % Tween 20) acrescido com 5 % leite desnatado. Após cinco lavagens por 5 minutos com o tampão de *blotting* adicionou-se o anticorpo anti-His•Tag[®] produzido em camundongos (Sigma-Aldrich) na diluição de 1:2.000. As membranas foram novamente lavadas cinco vezes

por 5 minutos com tampão de *blotting*. Em seguida, a ligação do anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Sigma-Aldrich) procedeu-se na diluição de 1:10.000. As membranas foram posteriormente lavadas e reveladas através da utilização do reagente *ECL* (Pierce) em filmes radiográficos, segundo as especificações do fabricante.

4.4.3 Quantificação da proteína purificada

Confirmada a identidade e a purificação da arginina quinase, a mesma foi submetida à microdosagem através do método descrito por Bradford (1976), que tem como princípio a medição do grau de associação entre proteínas e o corante *Coomassie Brilliant Blue G-250* por espectrofotometria a 595 nm. O espectrofotômetro utilizado foi o equipamento *BioPhotometer*[®] (Eppendorf).

4.5 Espectrometria de massas

Todos os procedimentos relacionados a espectrometria de massas foram realizados no *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), EUA, com o auxílio do Dr. Glauber Wagner e de Débora Denardin Lückemeyer, MSc.

4.5.1 Digestão das proteínas *in-gel*

A banda correspondente à AK foi previamente tratada com solução descorante I (50% metanol/5% ácido acético). Em seguida, incubada com a solução descorante II (50% acetonitrila (ACN) em 5 mM de carbonato de amônia (NH_4HCO_3) e desidratada com 200 μL de acetonitrila (ACN). O excesso de ACN foi removido em centrifugação sob vácuo (*SpeedVac*, Eppendorf). Após esta etapa de descoloração e desidratação, a banda foi tratada com 10mM de DTT para a redução dos grupamentos tiol das cisteínas, seguido da alquilação destes grupos tiol com 50mM de iodoacetamida (IAA). Posteriormente

os géis foram novamente incubados com solução descorante II e desidratados com ACN. Na sequência, as proteínas foram submetidas a digestão proteolítica *in-gel* com tripsina (Promega). Os peptídeos foram extraídos do gel com 100 µL de solução descorante II, sendo o sobrenadante contendo os peptídeos transferido para um novo tubo e os géis submetidos a novo tratamento com 50 µl de uma solução descorante I. Após este período, o sobrenadante foi transferido para o tubo contendo o sobrenadante obtido na primeira etapa de extração. Em seguida, a solução contendo os peptídeos foi desidratada por centrifugação a vácuo (*SpeedVac*, Eppendorf) e os peptídeos reconstituídos com 10 µl de 0,1% ácido fórmico (AF).

4.5.2 Análise por LC-ESI-MS/MS

Os peptídeos oriundos da digestão das proteínas em gel foram analisados em plataforma LC-ESI-MS/MS, composta por sistema de cromatografia líquida *NanoAcquity* (Waters) acoplado em linha com espectrômetro de massas *Nanospray LTQ Orbitrap Velos* (Thermo Fischer Scientific) no *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC/USA).

4.5.3 Identificação das proteínas

Os dados brutos (*raw*) de MS/MS oriundos dos espectrômetros de massas *qTOF* e *LTQ Orbitrap Velos* foram processados utilizando o programa *MASCOT Distiller*[®] (Matrix Science, Boston) e a busca na base de dados foi realizada utilizando o programa *MASCOT* (Matrix Science) e a base de dados do genoma *T. rangeli* (TrangeliDB) (LNCC, 2011).

4.6 Obtenção do antissoro dirigido a arginina quinase

4.6.1 Animais

Neste trabalho, foram utilizados camundongos fêmeas C57BL/6 oriundos do Biotério Setorial do MIP/UFSC. Os procedimentos de produção de antissoro foram realizados na observância dos preceitos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro

de Experimentação animal – COBEA, tendo sido previamente aprovados pela Comissão de Ética em Uso de Animais da UFSC (CEUA/UFSC) (Processo CEUA: 23080.025618/2009-81).

4.6.2 Imunização dos camundongos com a proteína arginina quinase recombinante

Para a produção de antissoro policlonal anti-arginina quinase, três camundongos C57BL/6 fêmeas foram imunizados por via subcutânea com 50 µg da proteína recombinante purificada. As imunizações foram realizadas a cada dez dias, sendo as proteínas emulsificadas em adjuvante completo de Freund (v/v) (Sigma-Aldrich) na primeira inoculação e com *Alu-Gel S* (Hidróxido de alumínio 1,3%) (Serva) nas outras três imunizações. Após a terceira imunização, a resposta imunológica anti-arginina quinase dos camundongos foi verificada através da técnica de *Western Blot*. Dez dias após a última imunização, foi retirado, através de punção cardíaca, aproximadamente 1 ml de sangue de todos os camundongos imunizados para a separação do antissoro policlonal.

4.7 Reatividade do soro policlonal contra proteínas arginina quinase

4.7.1 Extração de proteína dos parasitos

Proteínas das formas epimastigotas e tripomastigotas das cepas Choachí e SC-58 de *T. rangeli* e da cepa Y de *T. cruzi* foram extraídas através da homogeneização em tampão de lise (50 mM NaCl; 200 mM Tris-HCl pH 8,0; 1% Triton X-100) aquecido seguindo-se de centrifugação a 12.500 x g por 20 minutos a 4°C, do qual foi retirado o sobrenadante.

A concentração do extrato proteico obtido foi avaliada através de microdosagem pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando-se o equipamento *Infinite M200* (TECAN).

4.7.2 Detecção da expressão de proteínas arginina quinase por *Western Blot*

Extratos proteicos de diferentes formas (epimastigotas e tripomastigotas) das cepas Choachí e SC58 de *T. rangeli* foram avaliadas comparativamente quanto à expressão da arginina quinase. Como controles, foram utilizadas formas epimastigotas e tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, a proteína arginina quinase recombinante purificada (controle positivo) e o extrato proteico de bactérias *E. coli* não transformadas (controle negativo). Estas amostras foram resolvidas por SDS-PAGE 10% e transferidas para membranas de nitrocelulose e processadas para *Western Blot* conforme descrito no item 4.4.2, utilizando-se o antissoro anti-arginina quinase como anticorpo primário.

4.7.3 Avaliação dos níveis de expressão através do programa *ImageJ*

O ImageJ é um software para processamento e análise de imagens, desenvolvido por Wayne Rasband no National Institute of Mental Health, USA, em Java. Com ele é possível realizar várias tarefas de processamento e análise de imagens. Após a realização do *Western Blot* as imagens obtidas foram analisadas utilizando o programa ImageJ. As imagens são digitalizadas e possuem sua densidade óptica relativa calculada utilizando os padrões de α -tubulina como normalizador. Depois de obter os valores, um gráfico foi desenhado utilizando-se o programa *Excel* (Microsoft).

4.7.4 Citolocalização por ensaios de imunofluorescência

Para os ensaios de imunofluorescência, foram utilizadas formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli* e *T. cruzi*. Os parasitos foram coletados após centrifugação a $3.000 \times g$ (10 minutos) e duas lavagens em PBS pH 7,4, tendo sua concentração ajustada para 5×10^6 células/ml na mesma solução. Dessa suspensão, 50 μ l foram depositados sobre uma

lamínula circular de vidro (diâmetro de 12 mm) em placa de poliestireno (TPP) de 24 cavidades. Após 15 minutos de adesão dos parasitos na lamínula, realizou-se a fixação durante cinco minutos com paraformaldeído a 4% diluído em PBS pH 7,4. A lamínula foi, então, submetida a três lavagens de cinco minutos cada em PBS pH 7,4, sob leve agitação. Todas as etapas subsequentes foram também intercaladas com lavagens, nas mesmas condições. A permeabilização dos parasitos foi realizada com o detergente NP-40, na concentração de 5% em PBS pH 7,4, durante cinco minutos. O bloqueio de sítios inespecíficos na lamínula foi realizado durante uma hora à temperatura ambiente com solução de leite desnatado a 5%, diluído em PBS pH 7,4. O antissoro contra arginina quinase, na diluição de 1:25 em 2% leite desnatado/PBS pH 7,4, foi adicionado sobre as lamínulas e permaneceu em contato com os parasitos por 90 minutos à temperatura ambiente. O anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado ao corante fluorescente Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) foi diluído 1:1.000 em 2% leite desnatado/ PBS pH 7,4, sendo mantido sobre a lamínula por 15 minutos. A lamínula foi, então, corada por cinco minutos com 1 µg/ml de DAPI, sendo posteriormente montada com o meio *Hydromount* (National Diagnostics) em lâminas de microscopia. As análises foram realizadas sob os filtros *Wide Blue* (WB), para Alexa Fluor 488, e *Wide Ultraviolet* (WU), para o corante DAPI, em microscópio óptico de fluorescência Olympus – Bx40–FL (Olympus, Tóquio), sendo os resultados registrados digitalmente.

5 RESULTADOS

5.1 Amplificação, clonagem e análise da sequência do gene da arginina quinase de *T. rangeli*

Para o isolamento do gene da arginina quinase de *T. rangeli*, foi realizada a extração de DNA total do parasito pela técnica de fenol-clorofórmio. A partir da sequência obtida para a proteína arginina quinase de *T. rangeli* no transcriptoma, foram desenhados iniciadores para posterior amplificação do gene via PCR.

Utilizando os iniciadores desenhados para a amplificação do gene da arginina quinase de *T. rangeli*, foi realizada uma PCR com a temperatura média (55°C) encontrada para os iniciadores através de cálculo padrão da *T_m*. Devido a uma amplificação não específica, foi realizada uma PCR com gradiente de temperatura variando entre 54°C e 60°C (Figura 4). Porém, mesmo utilizando-se de um gradiente de temperatura, a amplificação continuou inespecífica, gerando novamente um padrão de amplificação majoritária de duas bandas, sendo uma delas do tamanho teórico esperado de 1.070 pb para o gene da arginina quinase. Devido a este fato, a amplificação continuou a ser realizada na temperatura de 55°C.

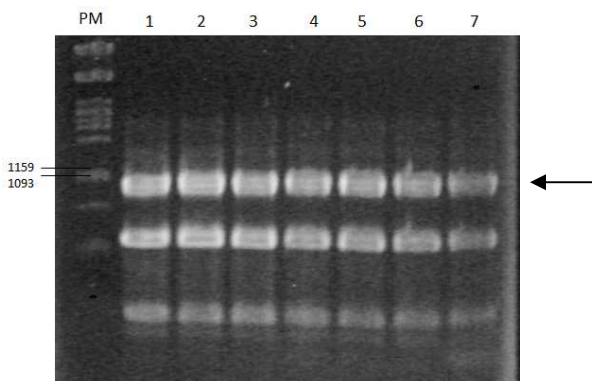


Figura 4: Eletroforese em gel de agarose a 1% corado por brometo de etídio revelando o produto de amplificação de 1070 pb do gene da

arginina quinase de *Trypanosoma rangeli* (cepa Choachí) (seta) em um gradiente de 54°C até 60°C para ligação dos iniciadores. PM – padrão de peso molecular em pares de bases (pb)(Fago Lambda digerido com *Pst*I) 1) 54°C; 2) 55,4°C; 3) 56,8°C; 4) 58,1°C; 5) 59,2°C; 6) 60°C; 7) 60,4°C.

Apesar deste padrão foi possível realizar a purificação do gene de interesse através da excisão do fragmento de interesse utilizando-se o kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare). O produto purificado de 1.070 pb correspondente ao gene da arginina quinase foi clonado no vetor pGEM-T easy® e transformado em células cálcio competentes DH5-α (*E. coli*). Para a confirmação de que o inserto se trata do gene da arginina quinase foi feita uma PCR das colônias selecionadas, utilizando os iniciadores M13 do plasmídeo (Figura 5).

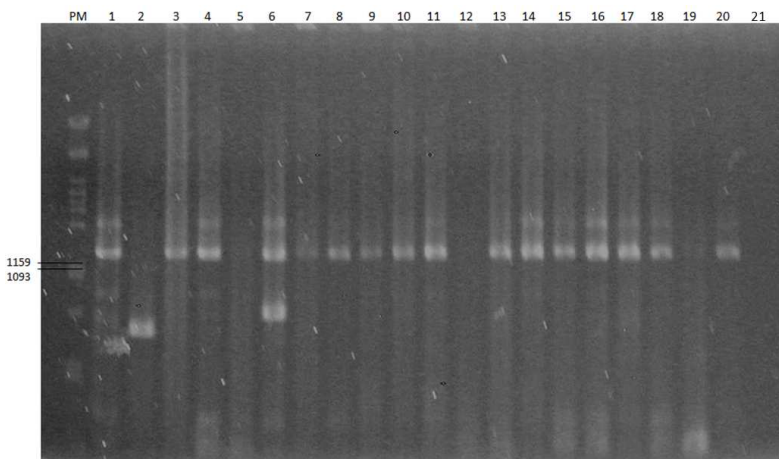


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose a 1% corado por brometo de etídio revelando o produto da amplificação do fragmento de tamanho semelhante ao esperado teórico (1070 pb + parte do plasmídeo amplificado ~200 pb) para o gene da arginina quinase de *Trypanosoma rangeli* (cepa Choachí) inserido no plasmídeo pGEM-T easy® Vector (Promega) presente nas colônias de *E. coli* DH5α eletrocompetentes. 1-20) Colônias testadas; 21) Controle negativo.

A partir da confirmação da presença do inserto no pGEM-T easy® Vector, foi realizada a lise alcalina destas células objetivando a extração do DNA plasmidial que em seguida foi sequenciado para a confirmação da identidade do gene da arginina quinase.

As sequências nucleotídicas obtidas foram analisadas quanto à qualidade e, por possuírem um valor de *Phred* igual ou superior a 20 (máximo de um erro em 100 pb, ou seja, 99 % de precisão), os resultados deduzidos a partir das mesmas foram considerados confiáveis. Dessa forma, realizou-se uma análise por *blastn* para comparação da sequência da arginina quinase de *T. rangeli* com as sequências descritas para organismos filogeneticamente relacionados, sendo que a similaridade entre as sequências de *T. rangeli* e *T. cruzi* foi de 89 %, porém através de *blastn* a sequência de *T. brucei* apresenta similaridade reduzida se comparado ao *T. cruzi*. Na comparação da sequência aminoacídica da AK de *T. rangeli* com outros organismos verificou-se a existência de similaridade entre as sequências de *T. rangeli*, *T. cruzi* e *T. brucei*. Entre *T. rangeli* e *T. cruzi* (GenBank: AAC82390.1) foi encontrada uma identidade de 91 %, e uma similaridade de 100 %, ao passo que entre *T. rangeli* e *T. brucei* (GenBank: AAF23164.2) a identidade foi de 83 % e a similaridade de 99 % (Figura 6). Os valores de identidade informam a percentagem de aminoácidos idênticos entre as sequências peptídicas analisadas, enquanto os valores de similaridade englobam também a percentagem de aminoácidos com propriedades semelhantes.

Os domínios de ligação de ADP, domínio de ligação da arginina e o *loop* de ligação do substrato foram identificados na *TrAK* através do programa *Conserved domains* do NCBI, sendo classificada como uma arginina quinase da superfamília das fosfagenos quinases. É possível ainda observar que a *TrAK* possui todos os domínios presentes na *TcAK* e na *TbAK1*, indicando a possibilidade de a *TrAK* ser funcional.

```

T_rangeli   MATPEATSKLEAAFAILQNASDCHSLKKYLQEVFDQLKEKQTKMGATLMDVIQSGVAN 60
T_cruzi     MASAENVVSKLEAAFAKLQNASDCHSLKKYLTKVFDQLKGKQTKMGATLMDVIQSGVEN 60
T_brucei    MATRDVAAELEKAFAKLQAAKDCQSLLKKYLTSDFVKKLKDKKTKLGATLLDVIQSGVQN 60
          **: :.:** ***,** *,**:*:*****,:*.:** ***,*:*:***** **

T_rangeli   LDSGVGVYAPDAESYTVFAPLFDPIIEDYHKGFKPTDKQPPKDFGDLFAFVDVDPQKYV 120
T_cruzi     LDSGIGVYAPDAESYTLFAALFDPIIEDYHKGFKPSDKQPPKDFGDLNTFIDVDPKKYV 120
T_brucei    LDSGVGLYAPDAEAYTVFADLFDPIEDYQNGFKVTDKQPPKDFGDLNTLVDVDPQKYV 120
          ****:*:*****:** ** ***:*****:*:*****:*****:.*:*****: **

T_rangeli   VSTRVRCGRSLEGYPFNPLKKEQYEEMESRVKDQLEIMTGELKGYYPPLTGMKTKETQQK 180
T_cruzi     ISTRVRCGRSLEGYPFNPLKKQYEEMESRVKGQLESMSELGKYYPLTGMKTKETQQK 180
T_brucei    ISTRVRCGRSLAGYPFNPLTKEQYEEMESRVREQLSMTDDQLGTYYPPLSGMTKTKETQQK 180
          :***** *****.*:*****: **.*:.*:.*:*****:*****:

T_rangeli   LIDHFLFKEGDRLQAGHACEFWPTGRGIYHNDKTLFWVWNEEDHLRIISMQKGGNLK 240
T_cruzi     LIDHFLFKEGDRLQAHAACKFWPTGRGIYHNDKTLFWVWNEEDHLRIISMQKGGNLK 240
T_brucei    LIDHFLFKEGDRLQAAGACEYFWPTGRGIYHNDKTLFWVWNEEDHLRIISKQKGGNLK 240
          *****.*:*****: *****.*:***** *****

T_rangeli   EVFGRVLVDGVNIEEKVKFSRDDRLGFLTFCPINLGGTIRASVHIKLPKLGADRKKLEEV 300
T_cruzi     EVFGRVLVAVGVIEEKVKFSRDDRLGFLTFCPINLGGTIRASVHIKLPKLGADRKKLEEV 300
T_brucei    EVFGRVLVKAVNIEKKVFSRDDRLGFLTFCPINLGGTIRAIIVHIKLPKLGADRAKLEEV 300
          *****.*:*****:*****.*:***** *****

T_rangeli   AAQYNLQVRGTAGEHSDSPDGVYDISNKRRLGLSEYEAVKEMQDGILELIKAEAEAE 357
T_cruzi     AAKYNLQVRGTAGEHSDSPDGVYDISNKRRLGLSEYEAVKEMQDGILELIKAESAR 357
T_brucei    AAKYNLQVRGTAGEHSDSPDGIYDISNKRRLGLSEYEAVKEMQDGILELIKLEKSK- 356
          **:*:*****.*:*****:*****:***** **

```

Figura 6. Alinhamento da *TrAK* com as sequências de proteínas arginina quinase de *Trypanosoma cruzi* (GenBank: AAC82390.1) e *T. brucei* (GenBank: AAF23164.2). Em destaque vermelho na sequência encontra-se o loop de ligação do substrato. Em azul os resíduos aminoacídicos do domínio de ligação da arginina e em verde os resíduos aminoacídicos do domínio de ligação do ADP.

5.2 Expressão heteróloga e purificação da arginina quinase

A realização da expressão da proteína heteróloga recombinante rTrAK se fez necessária para que posteriormente fosse utilizada para obtenção de antissoro policlonal anti-TrAK, que permitiria a avaliação de níveis de expressão da TrAK em formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli* e também para ensaios de citolocalização por imunofluorescência.

Foram realizados diferentes testes de expressão utilizando *E. coli* BL21(DE3), nas temperaturas de 27°C e 37°C durante 3 e 6 horas. Estas amostras foram sonicadas para a detecção da expressão na fração solúvel e insolúvel. Como é possível observar na Figura 7 A, a expressão da proteína do tamanho esperado de 40 kDa é perceptível somente nos controles não induzidos, em baixa quantidade e na fração insolúvel nas duas temperaturas e tempos.

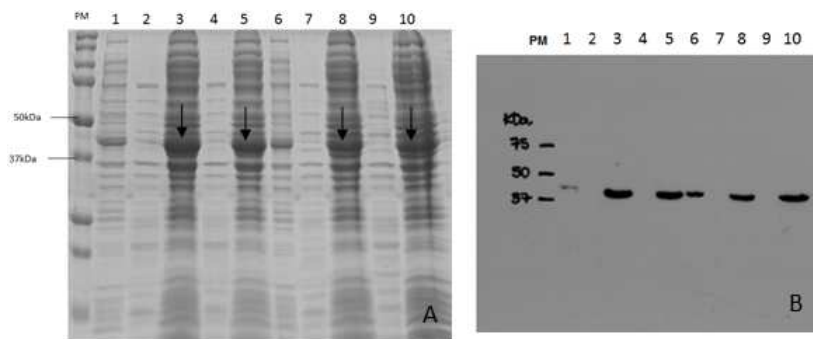


Figura 7: Análise da expressão heteróloga da proteína arginina quinase de *T. rangeli* em *E. coli* BL21(DE3). A) Em de gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) a 10% B) Western Blot realizado com o anticorpo anti-His•Tag® (Sigma-Aldrich). PM – Padrão de Tamanho Molecular (*Precision plus Protein Standards, BIORAD*); 1) Controle não induzido 37°C; 2) Fração Solúvel: 37°C 3h; 3) Fração Insolúvel: 37°C 3h; 4) Fração Solúvel: 37°C 6h; 5) Fração Insolúvel: 37°C 6h; 6) Controle não induzido 27°C; 7) Fração Solúvel: 27°C 3h; 8) Fração Insolúvel: 27°C 3h; 9) Fração Solúvel: 27°C 6h; 10) Fração Insolúvel: 27°C 6h – Setas indicam as bandas de interesse.

A expressão da proteína recombinante foi verificada por *Western Blot* utilizando anticorpo anti-His•Tag® (Sigma-Aldrich) (Figura 7B).

Como tentativa de otimização da expressão, duas diferentes cepas da célula BL21(DE3) foram utilizadas: a BL21(DE3) *plysS* e a BL21(DE3) *Codon plus*. Como é possível observar na Figura 8 A e B a expressão foi otimizada. *E. coli* BL21(DE3) *plysS* apresentou uma maior expressão na fração insolúvel, porém com *E. coli* BL21(DE3) *Codon plus* obteve-se uma expressão aumentada na fração solúvel quando crescida 6 horas a 27°C, revelada pela comparação visual da intensidade das bandas (Figura 8B – linha 9).

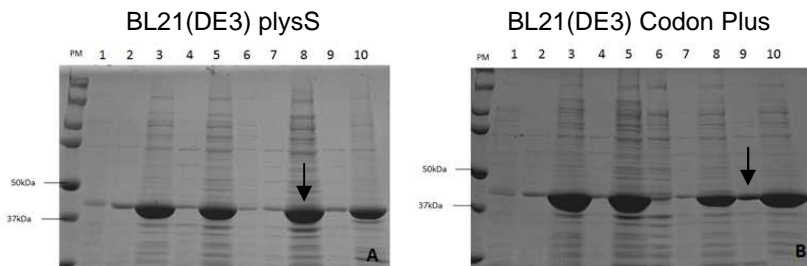


Figura 8: Análise da expressão heteróloga da proteína recombinante arginina quinase em: A) BL21(DE3) *plysS* e B) BL21(DE3) *Codon plus* através de gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) a 10%. PM – Padrão de Tamanho Molecular (*BenchMark™ Protein Ladder*, Invitrogen); 1) Controle não induzido 37°C; 2) Fração Solúvel: 37°C 3h; 3) Fração Insolúvel: 37°C 3h; 4) Fração Solúvel: 37°C 6h; 5) Fração Insolúvel: 37°C 6h; 6) Controle não induzido 27°C; 7) Fração Solúvel: 27°C 3h; 8) Fração Insolúvel: 27°C 3h; 9) Fração Solúvel: 27°C 6h; 10) Fração Insolúvel: 27°C 6h. Setas indicam condições de crescimento selecionadas para a purificação.

A purificação da *TrAK* recombinante (*rTrAK*) foi baseada em cromatografia por afinidade a metal utilizando resinas de níquel Ni-NTA agarose (Qiagen), pois a cauda de poli-histidina, presente nas proteínas recombinantes inseridas no vetor pET-14b, possui afinidade por esse elemento. Foram realizadas duas

purificações, uma da fração insolúvel produzida pela *E.coli* BL21(DE3) plysS expressa a 27°C durante 3 horas (Figura 9A) e uma da fração solúvel produzida pela *E.coli* BL21(DE3) Codon plus expressa a 27°C durante 6 horas (Figura 9B). As duas purificações foram realizadas com sucesso, assim como sua detecção por *Western Blot*, porém a fração solúvel possuía visivelmente maior quantidade, então por isto somente a fração solúvel foi utilizada para ensaios posteriores. A proteína purificada, bem como o sobrenadante, passagem inicial (*flow through*) pela coluna de purificação, as lavagens e as passagens de eluição foram também submetidas a um ensaio de *Western Blot* utilizando o anticorpo monoclonal anti-His•Tag®, dirigido à cauda de poli-histidina (Figura 9C). Uma vez que o anticorpo detectou a proteína purificada de cerca de 40 kDa principalmente nas eluições e muito pouco nas outras frações, pôde-se concluir que a proteína recombinante, rTrAK, foi purificada com sucesso.

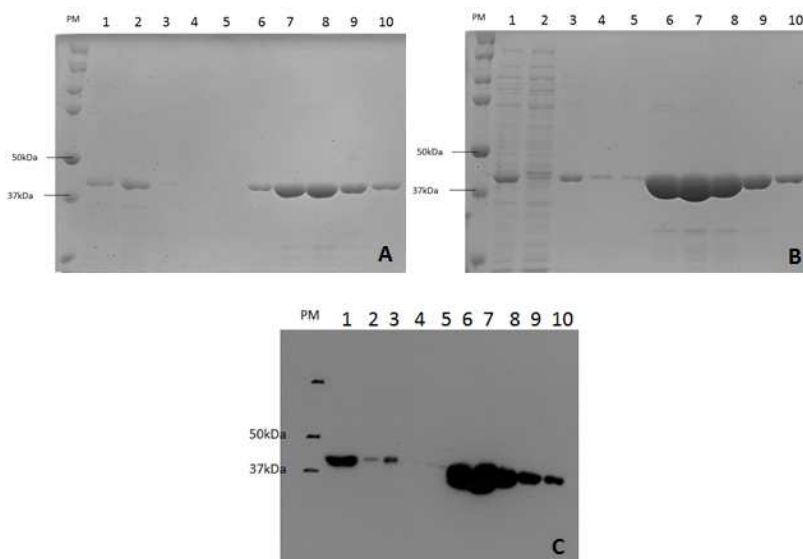


Figura 9: Análise da purificação da proteína recombinante arginina quinase em *E.coli*: A) BL21(DE3) plysS B) BL21(DE3) Codon plus através de gel de poliácridamida desnaturante (SDS-PAGE) a 10% e C)

BL21(DE3) Codon plus através de *Western Blot* utilizando o anticorpo monoclonal anti-His•Tag®. PM – Padrão de Tamanho Molecular (*Precision plus Protein Standards, BIORAD*); 1) Sobrenadante; 2) *Flow Through*; 3) Lavagem 1; 4) Lavagem 2; 5) Lavagem 3; 6) Eluição 1; 7) Eluição 2; 8) Eluição 3; 9) Eluição 4; 10) Eluição 5.

A proteína purificada foi quantificada através do método de Bradford. Através deste método, o rendimento da purificação da proteína foi de 338 mg de proteína por litro de cultura bacteriana. A partir desta quantificação três camundongos C57BL/6 foram imunizados com de 50 µg/dose da proteína purificada.

Uma amostra da proteína purificada foi analisada por espectrometria de massas e confirmou se tratar da arginina quinase de *T. rangeli* com 74% de cobertura (Figura 10).

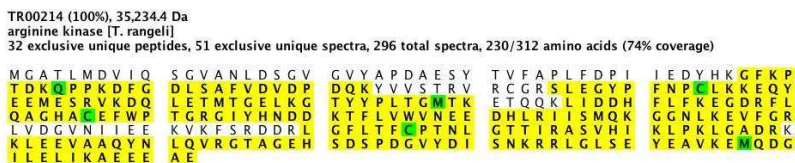


Figura 10: Resultados obtidos através da espectrometria de massas (Nano-LC ESI-MS/MS). Os peptídeos marcados em amarelo representam os peptídeos encontrados durante a análise.

5.3 Reatividade do soro policlonal contra proteínas arginina quinase

Após a obtenção do antissoro policlonal dirigido a proteína heteróloga recombinante *rTrAK*, foram realizados testes de reconhecimento por *Western Blot*, para que através do programa *ImageJ* utilizando-se a densidade optica relativa para avaliar os níveis de expressão em formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli*. O antissoro também foi utilizado para ensaios de imunolocalização, para a busca de sítios de expressão celular da *TrAK*.

5.3.1 Detecção da expressão de proteínas arginina quinase por *Western Blot*

O resultado da primeira análise mostrou que o antissoro produzido foi capaz de reconhecer especificamente uma banda no extrato proteico das formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli* e apresentou alta reatividade contra a rTrAK purificada (Figura 11). Não houve detecção de nenhum polipeptídeo no extrato de *T. cruzi*, e a proteína reconhecida em *T. rangeli* apresentou uma massa molecular cerca de ~45 kDa, sendo aproximadamente 5 kDa maior do que o teórico esperado para a TrAK (~40kDa). Com o objetivo de verificar a expressão diferencial da TrAK ao longo do ciclo biológico de *T. rangeli*, o extrato protéico de formas tripomastigotas também foi submetido ao *Western Blot*. Uma proteína de mesmo tamanho (~45 kDa) foi também detectada no extrato das formas tripomastigotas infectantes (Figura 11).

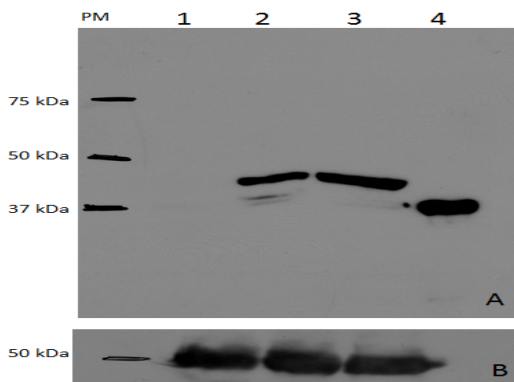


Figura 11: A arginina quinase está expressa de forma semelhante em formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli*. A) *Western Blot* utilizando o Antissoro policlonal anti-TrAK em extratos proteicos de formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli*, epimastigotas de *T. cruzi* e da proteína rTrAK. B) *Western Blot* utilizando o Anticorpo monoclonal anti-tubulina. 1) *T. cruzi* – Epimastigota; 2) *T. rangeli* – Tripomastigota; 3) *T. rangeli* – Epimastigota; 4) Proteína heteróloga purificada (rTrAK).

Para uma análise confirmatória foi realizado um segundo *Western Blot*, utilizando duas cepas de *T. rangeli* de duas linhagens genéticas distintas, Choachí (KP1+) e SC58 (KP1-), e duas cepas de *T. cruzi*, Y e Colombiana (Figura 12). É possível observar que a arginina quinase é unicamente reconhecida pelo antissoro anti-*TrAK* apenas nos extratos proteicos das cepas de *T. rangeli*.

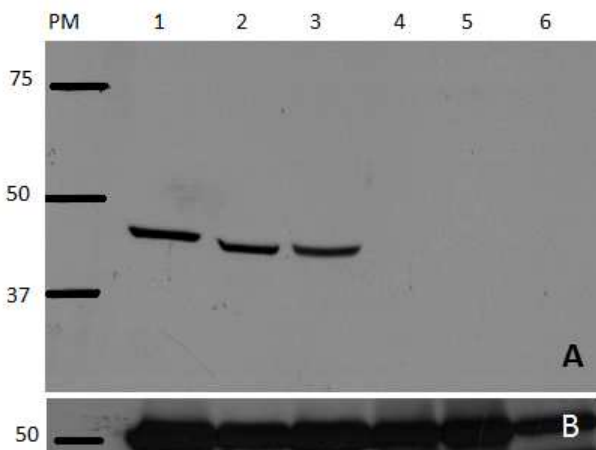
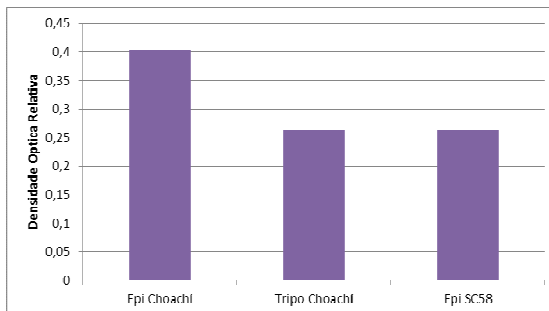


Figura 12: O anticorpo anti-rTrAK reconhece a arginina quinase de forma semelhante em cepas diferentes de *T. rangeli*. A) *Western Blot* do antissoro policlonal anti-*TrAK* produzido pelos camundongos. B) *Western Blot* do antissoro monoclonal anti-tubulina. 1) *T. rangeli* Choachí – Epimastigota; 2) *T. rangeli* Choachí – Tripomastigota; 3) *T. rangeli* SC58 – Epimastigota; 4) *T. cruzi* Y – Epimastigota; 5) *T. cruzi* Y – Tripomastigota; 6) *T. cruzi* Colombiana – Epimastigota.

A intensidade das bandas de cerca de 45 kDa detectadas nos extratos de *T. rangeli* foram quantificadas através do programa ImageJ como indicativo da expressão da AK. Os resultados estão apresentados no gráfico 1.

Gráfico 1: Gráfico demonstrativo da Densidade Óptica Relativa.



É possível observar que a expressão em epimastigotas de Choachí (0,402397) é maior do que a expressão em tripomastigotas de Choachí (0,262948) e epimastigotas de SC58 (0,263051).

5.3.2 Localização celular da *TrAK* por imunofluorescência

Com o objetivo de investigar o(s) sítio(s) de expressão celular da proteína arginina quinase nas diferentes formas biológicas de *T. rangeli*, o soro policlonal anti-*TrAK* foi também utilizado em ensaios de imunofluorescência indireta (Figura 13). Nas formas epimastigotas de *T. rangeli* o soro anti-*TrAK* apresentou uma marcação no corpo celular do parasito apontando para uma distribuição difusa pelo citoplasma ou pela membrana do tripanosoma e uma marcação de maior intensidade no flagelo. Por outro lado, nas formas tripomastigotas houve evidente reconhecimento pelo soro anti-*TrAK* do flagelo do *T. rangeli*, sendo a marcação no corpo celular bastante sutil.

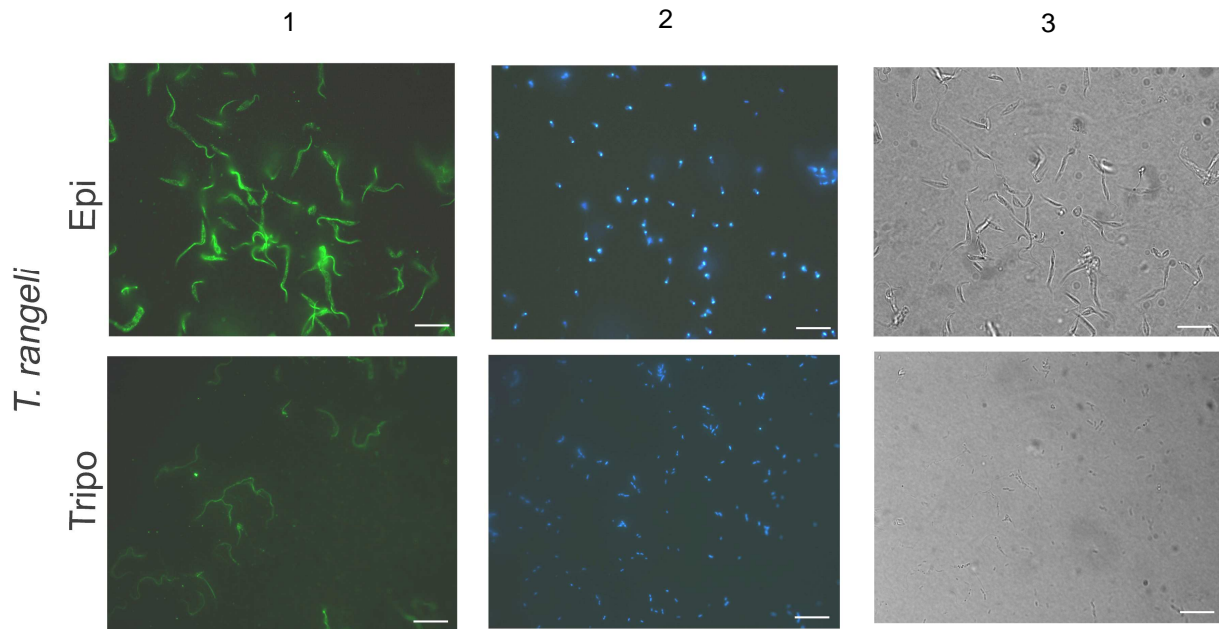


Figura 13. Citolocalização da *TrAK* em formas epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma rangeli* cepa Choachí por ensaio de imunofluorescência utilizando o soro policlonal anti-*TrAK*. As imagens representam microfotografias da expressão da *TrA* (1), núcleo e cinetoplasto corados com o reagente DAPI (2) e campo claro (3). As barras de aumento representam 10 μ m.

Apesar dos resultados negativos para o reconhecimento da AK em extratos de *T. cruzi* com o soro policlonal anti-TrAK, foi realizado um ensaio de citolocalização por imunofluorescência. Para a imunofluorescência foram utilizadas formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*. Nas formas epimastigotas, houve marcação do flagelo bem como do corpo basal e uma marcação difusa pelo citoplasma (Figura 14). Nas formas tripomastigotas, há o reconhecimento do flagelo e do corpo basal, porém a marcação é mais tênue, e também houve uma marcação mais expressiva do citoplasma do parasito.

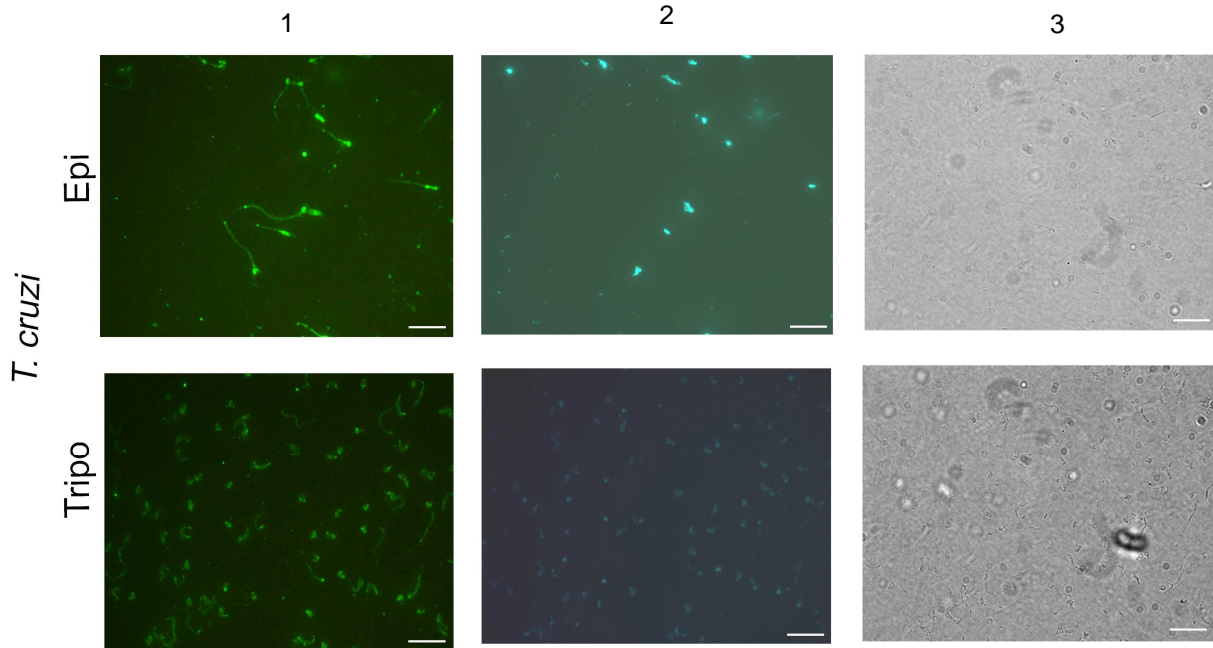


Figura 14. Citolocalização da proteína arginina quinase em formas epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* cepa Y através de ensaio de imunofluorescência utilizando o soro policlonal anti-*TrAK*. As imagens representam microfotografias da expressão da *TrAK* (1), núcleo e cinetoplasto corados com o reagente DAPI (2) e campo claro (3). As barras de aumento representam 10 μm .

6 DISCUSSÃO

A arginina quinase catalisa a transfosforilação reversível entre a adenosina difosfato (ADP) e a fosfoarginina, a qual está envolvida no tamponamento temporal e espacial de adenosina trifosfato (ATP) (PEREIRA, et al., 2003). Esta enzima está presente em Anelídeos, Celenterados, Platelminotos, Nemertíneos, Moluscos, Lofóforados, Artrópodes, Equinodermos, Hemicordados e Cordados, onde, como outras quinases, mantém a homeostase de ATP durante a contração muscular (PEREIRA, et al., 2000).

Atualmente a mais bem descrita arginina quinase em tripanosomatídeos é a de *T. cruzi*, cujo padrão de expressão sugere uma correlação entre atividade enzimática e a disponibilidade de nutrientes (PEREIRA, et al., 2003). Embora haja estudos envolvendo arginina quinases de outros tripanosomatídeos, somente a AK de *T. brucei* pode ser considerada bem descrita como a de *T. cruzi*. Nesse contexto, os resultados obtidos neste trabalho para a arginina quinase de *T. rangeli* (*TrAK*) são primariamente comparados com estudos estruturais e funcionais realizados em *T. cruzi*, embora alguns aspectos sejam passíveis de análise em relação a outros tripanosomatídeos. A *TrAK* até o momento segue o padrão estabelecido por Pereira e colaboradores (2000) para *T. cruzi*, um gene com aproximadamente 1.070 pb, codificando para uma proteína de 357 aminoácidos e um peso molecular de aproximadamente 40 kDa, os quais foram preditos a partir do gene e identificados por espectrometria de massa com 74 % de cobertura. O que dificulta a comparação da *TrAK* com a arginina quinase de *T. brucei* (*TbAK*) é o fato deste possuir três diferentes isoformas da AK com localizações celulares diferentes, a *TbAK1* se localiza no flagelo, a *TbAK2* nos glicossomos e a *TbAK3* no citosol.

Quando comparadas as sequências de AK de tripanosomatídeos, incluindo as sequências de *T. cruzi*, *T. brucei* e *T. rangeli*, observou-se que a similaridade abrange todos os

domínios enzimáticos presentes, o que nos leva a considerar que a *TrAK* seja uma enzima com função parecida a *TcAK* e *TbAK1*. Esse resultado fortalece a colocação de Uda e colaboradores (2006) de que apesar da organização do gene das AKs ser altamente divergente e variável, análises filogenéticas demonstram claramente a possibilidade dos genes das AKs serem homólogos tendo surgido de um ancestral comum.

Com o objetivo de analisar a expressão da arginina quinase de *T. rangeli*, a proteína foi produzida de forma recombinante em *E. coli* e, após purificação, utilizada na produção de antissoro. A opção pelo sistema bacteriano de expressão ocorreu devido às suas conveniências, como a fácil manipulação, as altas taxas de crescimento e produção de proteínas. Porém, este sistema apresenta aspectos negativos para a expressão de proteínas eucarióticas, uma vez que procariotos possuem certas limitações na realização de modificações pós-traducionais, na formação de pontes dissulfeto e mesmo no dobramento correto da proteína. Sendo assim, as proteínas eucarióticas expressas em *E. coli* normalmente são destinadas a corpos de inclusão bacterianos (BANEYX, 1999). Entretanto, este não foi o caso da *TrAK*, a qual foi obtida com alto rendimento, indicando que as condições de cultivo e de indução testadas foram adequadas, não tendo sido a *rTrAK* alocada em corpos de inclusão.

O bom rendimento obtido na expressão heteróloga e purificação da *rTrAK* da fração solúvel do extrato bacteriano (338 mg/l) corrobora as pesquisas realizadas por Canonaco e colaboradores (2003). Este trabalho mostra que a expressão heteróloga de arginina quinase por organismos que não possuem esta enzima, assim como bactérias e leveduras, pode ser um fator de resistência ao estresse nutricional. Leveduras recombinantes expressando AK de músculo de caranguejo mostraram melhora da resistência ao estresse quando submetidas a desafios de drenagem de energia celular.

Apesar do sucesso na expressão heteróloga e purificação, antes que se procedesse à imunização dos camundongos foi realizada a confirmação de que a proteína purificada tratava-se da AK recombinante através de *Western Blot* e espectrometria de

massas. Portanto, tendo a *TrAK* recombinante sido purificada de forma quantitativa e qualitativamente satisfatória, foi possível utilizá-la para imunizar camundongos.

O soro policlonal anti-*TrAK* detectou uma banda de aproximadamente 45 kDa (5 kDa acima do tamanho esperado) no extrato proteico total de formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli*. Este resultado não era esperado por 3 fatores: (1) a massa molecular predita a partir da sequência aminoacídica deduzida da *TrAK* ser 40 kDa, (2) a homóloga *TcAK* em *T. cruzi*, cuja identidade aminoacídica é de 91 %, apresenta apenas 40 kDa (PEREIRA et al., 2000) e, (3) a proteína recombinante produzida a partir da ORF da *TrAK* possuir apenas 40 kDa. Em *T. brucei*, a *TbAK1* descrita por Voncken e colaboradores (2013) possui 55 kDa. Esta diferença de tamanho na *TrAK* encontrada pode inferir algum tipo de modificação pós-traducional desconhecida na *TrAK*. Foi realizada uma análise para busca de possíveis glicosilações utilizando o programa *NetNGlyc* (www.expasy.com.br), porém não foram obtidos resultados positivos, dado que não foram encontradas glicosilações na sequência aminoacídica da *TrAK*. Desta forma, a natureza desta diferença de tamanho ainda carece de maior detalhamento.

Como descrito para *T. cruzi*, os níveis de expressão da AK aumentam continuamente durante a fase exponencial de crescimento dos epimastigotas, e quando a cultura atinge a fase estacionária estes níveis se mantêm constantes (ALONSO et al., 2001). Isto se dá pelas condições nutricionais durante o ciclo de vida de *T. cruzi*, pois, no hospedeiro mamífero tripomastigotas e amastigotas se beneficiam de um ambiente com maior constância, que inclui níveis estáveis de glicose e aminoácidos. Porém epimastigotas dependem das condições de alimentação do inseto vetor para obtenção de glicose e aminoácidos (PEREIRA et al., 2002). Seguindo estes padrões apresentados para *T. cruzi* as formas epimastigotas de *T. rangeli* também apresentam maiores níveis de expressão do que as formas tripomastigotas. Porém existe uma diferença em níveis de expressão entre as cepas utilizadas para este estudo.

Visivelmente a cepa Choachí possui níveis de expressão aumentados quando comparados com a cepa SC58.

Segundo Miranda e colaboradores (2009), a *TcAK* foi localizada principalmente em estruturas com forma semelhante a glicossomos. A localização da *TcAK* se mostrou como um padrão difuso ou pontuado, sendo que a hipótese levantada é que diferentes padrões são uma consequência de mecanismos de regulação agindo sobre as diferentes condições intra e extracelulares.

Já para *T. brucei*, Voncken e colaboradores (2013) demonstraram que este parasito expressa três isoformas diferentes de arginina quinase, *TbAK1-3*, sendo que cada uma possui uma localização subcelular diferente. A *TbAK3* é exclusivamente citosólica, enquanto a *TbAK1* é flagelar e a *TbAK2* é encontrada nos glicossomos. A *TrAK* apresenta localização celular no flagelo e bolsa flagelar principalmente, esta localização pode se dar pelo fato desta enzima fazer a de interconversão de fosfoarginina em ATP, aumentando assim a disponibilidade de ATP na região flagelar, onde este se faz necessário para a movimentação do parasito.

Os resultados da imunofluorescência podem ser considerados inconclusivos uma vez que não foi observado reconhecimento de proteínas de *T. cruzi* nos ensaios de *Western Blot*. Uma das possíveis razões para o *Western Blot* ter sido negativo e a imunofluorescência positiva para *T. cruzi* é a concentração do soro policlonal, já que no *Western Blot* a quantidade de anticorpos é baixa, enquanto na imunofluorescência é bem alta, o que pode induzir a um reconhecimento cruzado com outras proteínas do parasito. Além disso, existe a possibilidade de que o soro anti-*TrAK* reconheça epítomos estruturais, presentes no parasito íntegro utilizado na imunofluorescência, mas não no extrato protéico desnaturado utilizado para os ensaios de *Western Blot*. Os ensaios de citolocalização deverão ser refeitos e melhorados, partindo-se de uma purificação do anticorpo policlonal ou até mesmo a produção de um anticorpo monoclonal anti-AK.

Os ensaios apresentados neste trabalho mostram que a proteína *TrAK* possui características similares a *TcAK* tais como

tamanho do gene, possuindo uma similaridade de 89 %, e sua sequência aminoácida com uma identidade de 91 %, e uma similaridade de 100 %. Porém quando relacionada a localização celular a *TrAK* se aproxima da *TbAK-1*, pois ambas possuem localização predominantemente flagelar, apesar de suas sequências aminoácidas possuírem menor identidade (83 %) quando comparada a *TcAK*. Porém este compartilhamento de características já era esperado, por se tratarem de tripanosomatídeos que compartilham tantas outras características em comum, porém vale ressaltar que ensaios de atividade e outros estudos subsequentes devem ser realizados para obtenção de maiores informações a respeito da atividade da enzima *TrAK*.

7 CONCLUSÕES

- O gene da *TrAK* possui 1.070 pb gerando uma proteína de aproximadamente 357 aminoácidos, com peso molecular estimado em 40 kDa, porém quando é realizada a análise da proteína em extratos proteicos totais de *T. rangeli* esta se encontra com cerca de ~45 kDa.

- A análise da sequência aminoacídica deduzida da *TrAK* revelou a presença de domínios de ligação de ADP, domínios de ligação da arginina e o *loop* de ligação do substrato que são característicos das argininas quinases.

- A expressão heteróloga do gene da *TrAK* em *E. coli* foi obtida com sucesso, sendo a proteína recombinante detectada na fração solúvel do extrato bacteriano e purificada com um rendimento de 338 mg/l.

- O soro policlonal dirigido à *TrAK* recombinante revelou-se específico na diferenciação *T. rangeli* / *T. cruzi* em ensaios de *Western Blot*.

- A *TrAK* detectada em *T. rangeli* apresenta cerca de 45 kDa, sendo expressa tanto por formas epimastigotas de cultura como em formas tripomastigotas diferenciadas *in vitro*.

- Resultados de análise por imunofluorescência indireta apontam que a *TrAK* está distribuída pela membrana de todo o corpo celular, porém com marcação mais evidente no flagelo nas formas epimastigotas de *T. rangeli* e na membrana flagelar nas formas tripomastigotas.

8 PERSPECTIVAS

A realização deste estudo com a arginina quinase de *T. rangeli* mostrou o quanto ainda se tem para pesquisar e compreender a respeito dessa enzima em tripanosomatídeos. Nesse contexto, um importante passo a este estudo será realizar a purificação por adsorção do anticorpo anti-*TrAK* para novos ensaios de citolocalização e também avaliar a *TrAK* recombinante quanto à sua atividade, isoladamente e no *T. rangeli*.

A caracterização funcional e estrutural da *TrAK* em *T. rangeli* abre caminho e pode ser utilizada como modelo para a realização de mais estudos acerca dessas enzimas, cujos papéis são diversificados e fundamentais para o ciclo biológico de tripanosomatídeos.

A recente publicação do transcriptoma do *T. rangeli* (GRISARD et al., 2010) não excluiu a possibilidade de existência de mais isoformas da *TrAK*, o que requer estudos subsequentes, o que poderá ser melhor estudado com a publicação do genoma do parasito.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFCHAIN, D.; LE RAY, D.; FRUIT, J.; CAPRON, A. Antigenic make-up of *Trypanosoma cruzi* culture forms: Identification of a specific component. **Journal of Parasitology**, 65:507-514, 1979.

ALONSO, G.D.; PEREIRA, C.A.; REMEDI, M.S.; PAVETO, M.C.; COCHELLA, L; IVALDI, M.S.; BURGOS, N.M.G.; TORRES, H.N.; FLAWIÁ, M.M. Arginine kinase of the flagellate protozoa *Trypanosoma cruzi*: Regulation of its expression and catalytic activity. **FEBS Letters**, 498:22-25, 2001.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, 215:403-410, 1990.

BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnology**, 10:411-421, 1999.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72:248-254, 1976.

CANEPA, G.E.; CARRILLO, C.; MIRANDA, M.R.; SAYÉ, M.; PEREIRA, C.A. Arginine kinase in *Phytomonas*, a trypanosomatid parasite of plants. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, 160:40-43, 2011.

CANONACO, F.; SCHLATTNER, U.; WALLIMANN, T.; SAUER, U. Functional expression of arginine kinase improves recovery from pH stress of *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters**, 25(13):1013-7, 2003.

CUBA CUBA, A. Review of the biologic and diagnostic aspects of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. **Rev Soc Bras Med Trop**, 31:207-220, 1998.

D'ALESSANDRO, A. Biology of *Trypanosoma* (*Herpetosoma*) *rangeli* Tejera, 1920. In: W. H. R. Lumsden; D. A. Evans (Ed.). **Biology of the Kinetoplastida**. London: London Academic, 1976. 3:327-403.

D'ALESSANDRO, A.; MANDEL, S. Natural infections and behavior of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in the vector *Rhodnius prolixus* in Colombia. **The Journal of Parasitology**, 55:846-852, 1969.

D'ALESSANDRO, A.; SARAVIA, N. G. *Trypanosoma rangeli*. In: H. Gilles (Ed.). **Protozoal diseases**. London: Arnold Press, 1999. 398-41.

DE STEFANI MARQUEZ, D.; RODRIGUES-OTTAIANO, C.; OLIVEIRA, R. M.; PEDROSA, A.L.; CABRINE-SANTOS, M.; LAGES-SILVA, E.; RAMÍREZ, L.E. Susceptibility of diferente triatomine species to *Trypanosoma rangeli* experimental infection. **Vector-Borne Zoonotic Diseases**, 6:50-6, 2006.

EGER-MANGRICH, I.; DE OLIVEIRA, M.; GRISARD, E. C.; DE SOUZA, W.; STEINDEL, M. Interaction of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 with different cell lines *in vitro*. **Parasitology Research**, 87: 505-509, 2001.

EWING, B.; HILLIER, L. D.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, 8: 175-185, 1998.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, 8:186-194, 1998.

GINGER, M.L. Niche metabolism in parasitic protozoa. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, 361:101-118, 2006.

GRISARD, E. C.; STOCO, P. H.; WAGNER, G.; SINCERO, T. C.; ROTAVA, G.; RODRIGUES, J. B.; SNOEIJER, C. Q.; KOERICH, L. B.; SPERANDIO, M. M.; BAYER-SANTOS, E.; FRAGOSO, S. P.; GOLDENBERG, S.; TRIANA, O.; VALLEJO, G. A.; TYLER, K. M.; DÁVILA, A. M.; STEINDEL, M. Transcriptomic analyses of the avirulent protozoan parasite *Trypanosoma rangeli*. **Molecular Biochemical Parasitology**, 174(1):18-25, 2010.

GRISARD, E.C.; STEINDEL, M. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. In: **Parasitologia Humana**, D. P. Neves (Ed.). São Paulo: Editora Atheneu, 2005. 109-114.

GRISARD, E.C.; CAMPBELL, D.A.; ROMANHA, A.J. Mini-exon gene sequence polymorphism among *Trypanosoma rangeli* strains isolated distinct geographical regions. **Parasitology**, 118:375-382, 1999.

GRISARD, E.; STEINDEL, M.; GUARNERI, A. A.; EGER-MANGRICH, I.; CAMPBELL, D. A.; ROMANHA, A. J. Characterization of *Trypanosoma rangeli* strains isolated in Central and South America: overview. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 94:203-209, 1999.

GUHL, F.; VALLEJO, G. A. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920: an updated review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 98:435-442, 2003.

HERBIG-SANDREUTER, A. Experimental study of the life cycle of *Trypanosoma rangeli* Tejera 1920 in warm-blooded animals and in *Rhodnius prolixus*. **Acta Tropica**, 12:261-264, 1955.

KOERICH, L.B.; EMMANUELLE-MACHADO, P.; SANTOS, K.; GRISARD, E. C.; STEINDEL, M. Differentiation of *Trypanosoma rangeli*: high production of infective Trypomastigote forms in vitro. **Parasitology Research**, 88:21-25, 2002.

MIRANDA, M.R.; BOUVIER, L. A.; CANEPA, G. E.; PEREIRA, C. A. Subcellular localization of *Trypanosoma cruzi* arginine kinase. **Parasitology**, 136:1201-1207, 2009.

PEREIRA, C.A.; BOUVIER, L.A.; CÁMARA, M.M.; MIRANDA, M.R. Singular Features of Trypanosomatids' Phosphotransferases Involved in Cell Energy Management. **Enzyme Research**, 2011:1-12, 2011.

PEREIRA, C.A.; ALONSO, G.D.; IVALDI, S.; SILBER, A. M.; ALVES, M. J. M.; TORRES, H. N.; FLAWIÁ, M. M. Arginine kinase overexpression improves *Trypanosoma cruzi* survival capability. **FEBS Letters**, 554:201-205, 2003.

PEREIRA, C.A.; ALONSO, G.D.; IVALDI, S.; SILBER, A. M.; ALVES, M. J. M.; BOUVIER, L. A.; FLAWIÁ, M. M.; TORRES, H. N. Arginine metabolism in *Trypanosoma cruzi* is coupled to parasite stage and replication. **FEBS Letters**, 526:111-114, 2002.

PEREIRA, C.A.; ALONSO, G.D.; PAVETO, M.C.; IRIBARREN, A.; CABANAS, M.L.; TORRES, H.N.; FLAWIÁ, M.M. *Trypanosoma cruzi* Arginine Kinase Characterization and Cloning: A novel energetic pathway in protozoan parasites. **The Journal of Biological Chemistry**, 275:1495-1501, 2000.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2001. Vol. 1. 3rd edition.

SCHOTTELIUS, J. Neuraminidase fluorescent test for differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, 38:323-327, 1987.

STEINDEL, M.; DIAS NETO, E.; PINTO, C.J.; GRISARD, E.C.; MENEZES, C.L.; MURTA, S.M.; SIMPSON, A.J.; ROMANHA, A.J. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and

isoenzyme analysis of *Trypanosoma rangeli* strains. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, 41:261-267, 1994.

SUÁREZ, B.A.; CUERVO, C.L.; PUERTA, C.J. The intergenic region of the histone H2a gene supports two major lineages of *Trypanosoma rangeli*. **Biomedica**, 27:410-418, 2007.

TIELENS, A.G.M. and HELLEMOND, J.J. The electron transport chain in anaerobically functioning eukaryotes. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1365:71-78, 1998.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 76:4350-4354, 1979.

UDA, K.; FUJIMOTO, N.; AKIYAMA, Y.; MIZUTA, K.; TANAKA, K.; ELLINGTON, W. R.; SUZUKI T. Evolution of the arginine kinase gene family. **Comparative Biochemistry Physiology Part D Genomics & Proteomics**, 1(2):209-18, 2006.

VONCKEN, F.; GAO, F.; WADFORTH, C.; HARLEY, M.; COLASANTE, C. The Phosphoarginine Energy-Buffering System of *Trypanosoma brucei* Involves Multiple Arginine Kinase Isoforms with Different Subcellular Locations. **PLOS ONE**. 8(6):e65908, 2013.